



**Alice Fernandes Pinto    Fertilidade Feminina: O Tabagismo e a Reprodução  
Medicamentosa Assistida**



**Alice Fernandes Pinto      Fertilidade Feminina: O Tabagismo e a Reprodução  
Medicamentosa Assistida**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Saúde e Risco Ambiental, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e co-orientação do Professor Doutor João Luís Silva Carvalho, Professor Associado do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor Carlos Alberto Diogo Soares Borrego**  
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor Henrique Manuel Nunes de Almeida**  
Professor Associado do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina do Porto da Universidade do Porto

**Prof. Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira**  
Professora Associada com Agregação da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor João Luís Mendonça da Silva Carvalho**  
Professor Associado do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina do Porto da Universidade do Porto

## **agradecimentos**

Muitos foram os que se cruzaram comigo durante a realização deste trabalho e a eles quero agradecer todo o apoio, tanto profissional como pessoal, com que me brindaram:

À Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira, orientadora desta dissertação de Mestrado, pelas ideias preponderantes nos rumos escolhidos. Agradeço a sua atitude e disponibilidade, o entusiasmo e sobretudo a amizade.

Ao Professor Doutor João Luís Silva Carvalho, pelas opiniões e sugestões sempre valiosas e pertinentes que tanto me ensinaram.

A toda a equipa do Centro de Estudo e Tratamento de Infertilidade (CETI), agradeço o estímulo encorajador, a amizade e toda a colaboração cedida na execução deste trabalho.

À equipa do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho, EPE, o meu profundo agradecimento pela colaboração demonstrada na recolha de amostras necessárias para um complementar deste trabalho.

Ao CICECO e Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro agradeço todo o apoio proporcionado.

À Dra. Nair Campos pela forma como me acolheu na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pela sua disponibilidade no decorrer das experiências efectuadas, carinho e amizade.

Ao Professor Iman Al-Saleh do Departamento de Biologia do Centro King Faisal, pelas sugestões fornecidas para a determinação do biomarcador.

Um muito obrigado ao Dr. José Coelho, ao Professor Doutor Carlos Miguez e ao Professor Doutor António Nogueira pela ajuda na revisão de dados e análise estatística.

A todos os meus amigos, com quem partilhei alegrias e preocupações, pelas palavras de incentivo, amizade e confiança que sempre me transmitiram.

Aos meus pais e irmão, por sempre me terem encorajado, até nos momentos de maior desânimo, e nunca terem deixado de acreditar em mim.

A Ti agradeço o carinho com que me acompanhaste nesta etapa final.

Sem vocês não teria chegado até aqui, e não seria a pessoa que sou hoje...

## palavras-chave

Tabagismo, Cotinina, Reprodução Medicamente Assistida

## resumo

A saúde reprodutiva é um bem essencial à continuidade da vida. A avaliação da saúde reprodutiva feminina torna-se relevante, dado que nos dias de hoje as mulheres estão cada vez mais expostas ao fumo ambiental do tabaco (FAT), podendo este facto ter repercussões a nível da sua fertilidade. O presente trabalho teve como objectivo determinar os níveis de cotinina no líquido folicular (LF) de forma a estabelecer uma relação com os diferentes parâmetros laboratoriais e clínicos de um programa de fertilização *in vitro*. Para tal, foram estudados 78 casais. Os grupos foram formados de acordo com os hábitos tabágicos das mulheres, identificados por intermédio de uma entrevista: não fumadoras (NF; n=35); fumadoras passivas (FP; n=32); e fumadoras activas (FA; n=11). As amostras de LF, provenientes do folículo dominante, foram isoladas de forma a evitar contaminação por células sanguíneas. Os níveis de cotinina foram determinados pelo método ELISA, utilizando um Kit comercial. Posteriormente, foram analisados, os parâmetros laboratoriais e clínicos de acordo com os diferentes grupos. Foi encontrada uma forte correlação entre os níveis de cotinina no LF e os relatos de exposição ao FAT. Nas FA, os níveis foram significativamente superiores aos dos outros grupos ( $P < 0.001$ ). Os níveis de cotinina no LF das FP não diferiram significativamente das NF. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0.05$ ) nos diferentes parâmetros laboratoriais entre as mulheres NF, FP e FA, respectivamente: ao número médio de ovócitos recuperados ( $7.5 \pm 4.0$ ,  $8.3 \pm 4.9$ ,  $8.1 \pm 4.3$ ); taxas de fertilização (70.3%, 69.2%, 58.3%), e percentagens de embriões de boa qualidade (82.5%, 85.2%, 75.0%). Relativamente aos parâmetros clínicos, as FA evidenciaram uma tendência para uma menor taxa de gravidez clínica (27.3%), quando comparada com as da FP (46.9%) e NF (51.4%). Esta tendência foi também observada na taxa de implantação (20.0%, 32.0%, 30.1%, respectivamente), contudo sem diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0.05$ ) nos dois resultados. O presente estudo provou, que a cotinina no LF é um importante biomarcador para validação dos hábitos tabágicos. Contudo, não foi observada uma influência estatisticamente significativa dos hábitos tabágicos nos parâmetros de fertilização *in vitro*, chamando a atenção para o estudo de outras variáveis nos tratamentos de infertilidade.

## keywords

Smoking Habits, Cotinine, Assisted Reproductive Technologies

## abstract

Reproductive health is an important issue for continuity of life. The evaluation of female reproductive health is relevant, due to a wide range of women exposed to Environmental Tobacco Smoke (ETS). This fact may impair their fertility. The purpose of the present study was to determine cotinine levels within follicular fluid (FF), in order to establish some relationships with different biological and clinical parameters of an in vitro fertilization program.

For this purpose, 78 couples were studied. Groups were made according to women's smoking habits, identified through an interview: non-smokers (NS; n=35); passive smokers (PS; n=32); and active smokers (AS; n=11). FF samples were obtained from the dominant follicle, which was isolated in order to keep them free of blood contamination. Cotinine levels were evaluated by ELISA, using a suitable commercial kit. Taking in account the different groups, biological and clinical parameters were further analysed.

A strong correlation between the levels of cotinine in FF and self reported ETS was found. In AS, the level was significantly greater than in other groups ( $P<0.001$ ). The levels of cotinine in the FF in PS didn't differ significantly from NS. No significant differences ( $P>0.05$ ) on the different biological parameters were noted among NS, PS and AS women, respectively: mean number of retrieved oocytes ( $7.5\pm4.0$ ,  $8.3\pm4.9$ ,  $8.1\pm4.3$ ; fertilization rate (70.3%, 69.2%, 58.3%), and percentage of high-quality embryos (82.5%, 85.2%, 75.0%). In relation to clinical parameters, AS evidenced a tendency to a lower clinical pregnancy rate (27.3%) when compared to PS (46.9%) and NS (51.4%). This tendency was also noted in implantation rate (20.0%, 32.0%, 30.1%, respectively), although no statistical differences were found ( $P>0.05$ ) in both results.

Our study proved that cotinine in follicular fluid are suitable biological marker for the validation of smoking habits. However, a statistical significant influence of smoking habits in IVF parameters was not observed in the present study, alerting for other topics on fertility treatment outcomes.

<b>ÍNDICE GERAL.....</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xi</b>
 <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	 <b>1</b>
<b>1.1 A Saúde Reprodutiva.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 A Saúde Reprodutiva Feminina.....	3
<b>1.2. Fisiologia Reprodutiva Feminina.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 A Infertilidade e a Reprodução Medicamente Assistida.....</b>	<b>12</b>
1.3.1 Causas de Infertilidade.....	14
1.3.1.1 Infertilidade Masculina.....	14
1.3.1.2 Infertilidade Feminina.....	15
1.3.1.3 Infertilidade Idiopática.....	15
1.3.2 O tratamento da Infertilidade.....	17
1.3.3 As técnicas laboratoriais de Reprodução Medicamente Assistida.....	18
<b>1.4 O Tabagismo em Portugal e Políticas de Prevenção.....</b>	<b>20</b>
1.4.1 Componentes do fumo do tabaco prejudiciais à saúde.....	21
1.4.2 O Fumo Ambiental do Tabaco e as suas propriedades físico-químicas.....	22
1.4.2.1 A corrente do fumo Terciária.....	23
1.4.2.2 A corrente do fumo Secundária.....	23
1.4.2.3 Diferenças na composição entre o fumo da corrente terciária e secundária.....	24
1.4.3 Biomarcadores de exposição ao fumo do tabaco.....	24
<b>1.5 O tabaco, a Infertilidade e a Reprodução Medicamente Assistida.....</b>	<b>27</b>
<b>1.6 Enquadramento e Objectivos.....</b>	<b>34</b>
 <b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	 <b>35</b>
<b>2.1 População Estudada.....</b>	<b>37</b>
<b>2.2 Aspectos Éticos.....</b>	<b>39</b>
<b>2.3 Protocolo Clínico de Estimulação Ovária.....</b>	<b>40</b>
<b>2.4 Protocolo de Punção Folicular.....</b>	<b>41</b>

<b>2.5 Selecção de espermatozóides em amostras de esperma para técnicas de Reprodução Medicamente Assistida.....</b>	<b>41</b>
<b>2.6 As técnicas de Reprodução Medicamente Assistida .....</b>	<b>42</b>
2.6.1 FIV.....	42
2.6.2 ICSI.....	42
<b>2.7 Avaliação da Fecundação e do Desenvolvimento Embrionário.....</b>	<b>43</b>
<b>2.8 Classificação da Qualidade Embrionária.....</b>	<b>44</b>
<b>2.9 Transferência Embrionária e Análise da Gravidez.....</b>	<b>49</b>
<b>2.10 Protocolo experimental para avaliação do efeito do fumo do tabaco nos diferentes parâmetros do programa de Fertilização <i>in vitro</i>.....</b>	<b>50</b>
2.10.1 Avaliação dos hábitos tabágicos dos casais pelo método de entrevista e caracterização dos grupos de estudo.....	50
2.10.2 Isolamento das amostras de Líquido Folicular.....	51
2.10.3 Determinação da concentração de cotinina no líquido folicular pelo método bioquímico ELISA.....	51
<b>2.11 Variáveis estudadas no programa de fertilização <i>in vitro</i>.....</b>	<b>52</b>
<b>2.12 Análise Estatística.....</b>	<b>53</b>
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
<b>3.1 População em estudo.....</b>	<b>57</b>
<b>3.2 Hábitos tabágicos das mulheres em estudo.....</b>	<b>61</b>
3.2.1 Descrição da população em estudo tendo em conta os hábitos tabágicos das mulheres.....	64
3.2.2 Níveis de cotinina no líquido folicular.....	64
<b>3.3 Exposição das mulheres ao fumo do tabaco e os diferentes parâmetros laboratoriais do programa de fertilização <i>in vitro</i>.....</b>	<b>68</b>
<b>3.4 Exposição das mulheres ao fumo do tabaco e os diferentes parâmetros clínicos do programa de fertilização <i>in vitro</i>.....</b>	<b>69</b>
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>



<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>83</b>
<b>6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>87</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>91</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>109</b>
<b>Anexo 1</b> Valores de referência para parâmetros de um espermograma.....	111
<b>Anexo 2</b> Lei N.º 32-2006 de 26 de Julho.....	115
<b>Anexo 3</b> Lei N.º 37-2007 de 14 de Agosto.....	123
<b>Anexo 4</b> Lista de alguns constituintes conhecidos do Fumo Ambiental do Tabaco.....	135
<b>Anexo 5</b> <i>Ratios</i> entre os constituintes do fumo da corrente terciária e corrente secundária.....	141
<b>Anexo 6</b> Entrevista.....	145

## A - TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Estimativa do número de mortes por várias causas atribuídas ao tabaco em Portugal e por faixa etária (1995).	20
<b>Tabela 2:</b> Atribuição da qualidade embrionária em função das diferentes variáveis consideradas.	47
<b>Tabela 3:</b> Designação da qualidade de blastocistos em função das diferentes variáveis consideradas.	49
<b>Tabela 4:</b> Critérios de exclusão do presente estudo.	57
<b>Tabela 5:</b> Características da população em estudo e resultados globais de acordo com a obtenção ou não de gravidez.	59
<b>Tabela 6:</b> Características e resultados globais da população de acordo com a técnica de RMA.	60
<b>Tabela 7:</b> Características e resultados globais da população em estudo consoante o dia da transferência.	61
<b>Tabela 8:</b> Características dos grupos de estudo.	64
<b>Tabela 9:</b> Níveis de cotinina no grupo FP, tendo em conta a origem e intensidade do FAT.	66
<b>Tabela 10:</b> Concentração de cotinina no líquido folicular tendo em conta o último cigarro fumado em relação ao dia da punção folicular.	67
<b>Tabela 11:</b> Análise dos parâmetros laboratoriais nos diferentes grupos de estudo.	68
<b>Tabela 12:</b> Análise dos parâmetros clínicos nos diferentes grupos de estudo.	69

## B -FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Órgãos do sistema reprodutor feminino.	5
<b>Figura 2:</b> Corte do ovário humano e representação do desenvolvimento folicular.	9
<b>Figura 3:</b> Alterações hormonais no ciclo menstrual humano.	11
<b>Figura 4:</b> Diferentes causas de infertilidade em casais inférteis, 2005.	17
<b>Figura 5:</b> Taxa de gravidez por punção e por transferência de embriões consoante a técnica de RMA aplicada.	19
<b>Figura 6:</b> Via de transformação da nicotina em cotinina através do complexo citocromo P450.	25
<b>Figura 7:</b> Taxas de fertilidade e abortamento espontâneo em função da idade materna.	27
<b>Figura 8:</b> Mecanismos através dos quais o fumo do tabaco emitido por um cigarro afecta a função reprodutiva feminina.	29
<b>Figura 9:</b> Alteração nos parâmetros de fertilização <i>in vitro</i> resultantes da exposição das mulheres ao fumo do tabaco.	32
<b>Figura 10:</b> Classificação pronuclear proposto por Scott e colaboradores (2002).	46
<b>Figura 11:</b> Embriões de 4 a 8 blastómeros com 10% de fragmentações.	48
<b>Figura 12:</b> Embriões com cerca de 11-25 % de fragmentação.	48
<b>Figura 13:</b> A – Embrião com fragmentação > 35%; B – Embrião com fragmentação tipo IV	48
<b>Figura 14:</b> Distribuição das mulheres por grupos, tendo em conta os seus hábitos tabágicos (%).	62
<b>Figura 15:</b> Origem da exposição das mulheres ao FAT no grupo FP (%).	63
<b>Figura 16:</b> Intensidade da exposição das mulheres ao FAT no grupo FP (%).	63
<b>Figura 17:</b> Níveis de cotinina (ng/ml) nos grupos de estudo.	65
<b>Figura 18:</b> Níveis de cotinina (ng/ml) nos grupos FAL e FAM.	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>β- hCG</b>	Subunidade β Gonadotrofina Coriônica Humana
<b>AMH</b>	Hormona anti-Mullerian
<b>ASEBIR</b>	Associação para o estudo da Biologia e da Reprodução
<b>ASRM</b>	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
<b>CETI</b>	Centro de Estudo e Tratamento de Infertilidade
<b>CFA</b>	Contagem do número de folículos antrais
<b>C.I.P.D</b>	Conferência Internacional sobre a População e Desenvolvimento
<b>CPN</b>	Corpos precursores dos nucléolos
<b>DST</b>	Doenças sexualmente transmissíveis
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>ESHRE</b>	<i>European Society for Human Reproduction and Embriology</i>
<b>FA</b>	Fumadoras activas
<b>FAL</b>	Fumadoras activas ligeiras
<b>FAM</b>	Fumadoras activas moderadas
<b>FAT</b>	Fumo Ambiental do Tabaco
<b>FIV</b>	Fertilização <i>in vitro</i>
<b>Flt-1</b>	<i>c-fms-like tyrosine Kinase</i>
<b>FP</b>	Fumadoras passivas
<b>FSH</b>	Hormona folículo-estimulante
<b>GnRH</b>	Hormona libertadora das gonadotrofinas
<b>GP</b>	Glóbulo polar
<b>hCG</b>	Hormona gonadotrófica coriônica humana
<b>ICSI</b>	Injecção intracitoplasmática de espermatozóide
<b>IMC</b>	Índice de massa corporal
<b>INE</b>	Instituto Nacional de Estatística
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>NF</b>	Não fumadoras
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PF</b>	Punção folicular
<b>PN</b>	Pronúcleos
<b>RMA</b>	Reprodução Medicamente Assistida
<b>SPM</b>	<i>Sperm Preparation Medium</i>
<b>TE</b>	Transferência embrionária
<b>TEC</b>	Transferência de embriões criopreservados
<b>TESE</b>	<i>Testicular Sperm Extraction</i>
<b>U.S. – NRC</b>	<i>Unites States Nuclear Regulatory Commission</i>
<b>VEGF</b>	Factor de crescimento endotelial-vascular

## **1.1 A SAÚDE REPRODUTIVA**

É difícil exprimir com exactidão o que é a saúde, mas torna-se fácil compreender que a saúde reprodutiva é um bem inquestionável e essencial à continuidade da vida.

A expressão “Saúde Reprodutiva” foi adoptada em 1994 pela Conferência Internacional sobre a População e Desenvolvimento (C.I.P.D) que teve lugar no Cairo, sendo entendida como “um estado de bem-estar físico, psíquico e social, e não apenas a mera ausência de doença ou enfermidade, em tudo o que diz respeito ao sistema reprodutivo bem como às suas funções e processos. Implica que as pessoas possam ter uma vida sexual satisfatória e segura e que tenham a capacidade de se reproduzirem, bem como a liberdade de decidir se, quando e com que frequência o fazem. Esta última condição implica o direito de homens e mulheres terem acesso a métodos de planeamento familiar da sua escolha (...)” (Direcção-Geral da Saúde, 2001).

Pode-se vislumbrar, da própria definição, que o conceito acima referido inclui, de entre outros, aspectos sociais e culturais. Assim, o sistema de saúde é confrontado, por um lado, com a saúde como sendo um bem social em que há uma evidente exigência de cuidados de saúde de qualidade e, por outro, como meio de garantir a todos os cidadãos a equidade e a continuidade dos cuidados.

### **1.1.1 A SAÚDE REPRODUTIVA FEMININA**

Durante os últimos séculos, tem sido atribuída uma importância crescente à saúde reprodutiva feminina uma vez que são atribuídas às mulheres funções de provedoras e cuidadoras do bem-estar familiar, “mãe e esposa”, convertendo-as em agentes da saúde.

O universo feminino mudou muito desde a década de 60. As mulheres passaram a frequentar as universidades e a lutar pelo seu próprio espaço no mercado de trabalho. Paralelamente, o desenvolvimento de métodos anticoncepcionais seguros, como a pílula, permitiu que a mulher definisse o momento mais oportuno para atingir uma gravidez. Hoje em dia, devido ao competitivo mercado de trabalho e à acumulação de funções sociais, muitas optam por ter filhos mais tardiamente.

As alterações dos padrões demográficos ocorridas nos países desenvolvidos colocam os problemas da baixa taxa de natalidade e da renovação de gerações como questões sensíveis das sociedades contemporâneas, antevendo-se-lhes significativas repercussões para os próximos decénios.

De um grande número de nascimentos e elevada taxa de mortalidade infantil, característicos do princípio do século, transitou-se para uma estrutura familiar mais pequena, mas também com mais saúde e melhores condições socioeconómicas.

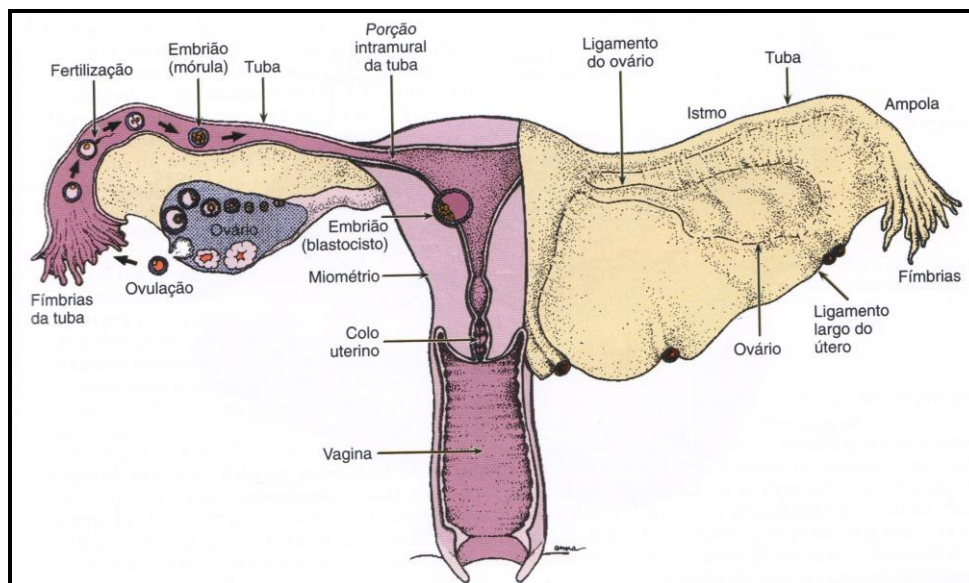
Saliente-se o contributo de numerosos casos de infertilidade, de que se verifica uma progressão crescente e que a coloca como um dos mais importantes problemas de saúde das sociedades modernas.

Aceitar a infertilidade como doença, quer física quer psicológica para o casal, foi o primeiro passo, talvez o mais importante, para que a comunidade científica e civil visse reconhecida a necessidade de se investir nessa matéria.

## **1.2 FISIOLOGIA REPRODUTIVA FEMININA**

A fisiologia do aparelho reprodutivo feminino é bastante complexa. De facto, a mulher experimenta, ao longo da vida e até mesmo durante o seu ciclo menstrual, um conjunto de alterações nos ovários e no útero, resultado da influência de um complexo mecanismo hormonal de regulação automática conhecido por eixo hipotálamo – hipófise – gónada.

O sistema reprodutor feminino (Figura 1) é constituído pelas gónadas ou glândulas sexuais – os ovários (têm a função de produzir as células reprodutoras femininas, óvulos e de produzirem as hormonas sexuais femininas: estrogénios e progesterona) e pelas vias genitais – duas trompas Falópio (com a função de condução dos óvulos ao útero sendo também o local de fecundação), útero (local de alojamento e desenvolvimento do novo ser até ao seu desenvolvimento) e vagina (recepção dos espermatozóides). O sistema urinário e os ductos reprodutivos estão fisicamente separados (Vander *et al.*, 2001).



**Figura 1.** Órgãos do sistema reprodutor feminino (Junqueira e Carneiro, 2008).

Os ovários de uma mulher adulta são glândulas de forma ovóide, com cerca de 3 cm de diâmetro e cerca de 1,5 cm de espessura máxima, que apresentam duas funções essenciais: oógenese e liberação do gameta feminino, óvulo, em cada ciclo menstrual (função gametogénica) e produção de hormonas esteróides na sua maioria (função endócrina). Histologicamente, num corte longitudinal, observam-se no ovário duas zonas distintas: a zona cortical, uma zona periférica com numerosos folículos ováricos em diferentes fases de desenvolvimento, que contêm os oócitos ou células germinativas femininas e a zona medular, uma zona interna rica em vasos sanguíneos (Junqueira e Carneiro, 2008).

O útero tem a forma de pêra, com a sua porção dilatada, o corpo, correspondendo a aproximadamente dois terços do seu tamanho, sendo a parte superior o fundo do útero. A parte inferior, denominada de colo, abre-se na vagina. A parede do útero é formada por três túnicas que, do exterior para o interior são: serosa, miométrio e a mucosa ou endométrio. Este é formado por um epitélio e lâmina própria composta por glândulas que segregam muco. Mensalmente, esta camada sofre descamação, caracterizando a menstruação (Junqueira e Carneiro, 2008).

A oogénese ocorre nos ovários, tal como se referiu anteriormente. A criança do sexo feminino, já nasce com um conjunto de oócitos (oócitos I) em metafase I. Estes oócitos I entram numa fase de longo repouso até à puberdade, que é marcada pelo reatamento da oogénese. A partir da puberdade, os oócitos I terminam a divisão meiótica, tendo como resultado um oócito II e um pequeno glóbulo polar (GP), cada um com um número haplóide de cromossomas (Eskandari e Cadieux, 2003).

Segue-se então a 2ª divisão meiótica que prossegue até metafase II. A meiose só termina se houver fecundação. Se assim for, o oócito II dá origem a um ovo e a um 2º GP no final da 2ª divisão meiótica. O ovo é portanto constituído por um pronúcleo masculino e um feminino, que vão sofrer uma junção e formar um núcleo diplóide – o zigoto – que começará então a dividir-se (Eskandari e Cadieux, 2003). Em suma, as fases de oogénese que incluem a multiplicação, crescimento e o início da maturação, ocorrem no ovário do embrião. Ainda durante a vida fetal deixa de ocorrer a fase de multiplicação e inicia-se a degenerescência de oócitos I.

O óvulo é uma célula esférica, com citoplasma rico em reservas nutritivas necessárias ao embrião nos primeiros dias.

Na mulher pós-pubertária ocorrem alterações cíclicas repetitivas no eixo hipotalâmico-pituitário-ovário, que produzem quer gâmetas, quer um ambiente uterino preparado para suportar uma gravidez, em caso de ocorrer fecundação (Heffner, 2001).

O ciclo ovário tem uma duração em média de 28 dias. Divide-se em fase folicular, ovulatória, e a luteínica. A fase folicular compreende o desenvolvimento de 6 a 12 folículos que iniciam, mensalmente, o processo de maturação. Apenas um dos folículos conclui a maturação, degenerando-se os restantes, terminando com a ovulação. As células foliculares e a teca produzem estrogénios. A fase luteínica, que ocorre após ovulação, envolve a formação, evolução e regressão do corpo lúteo (corpo amarelo) que produz progesterona e alguns estrogénios. Na ausência de concepção, cada ciclo termina com a hemorragia menstrual.

A cronologia da fase folicular do ciclo menstrual inicia-se no primeiro dia da menstruação, compreende o período do recrutamento de folículos, selecção do folículo dominante e proliferação do endométrio, e termina no dia em que surge o pico de hormona



luteinizante (LH). Estruturalmente, os folículos ováricos apresentam forma esférica ou ovóide e são constituídos por um número variável de camadas de células somáticas concêntricas à volta de um único gâmeta feminino redondo, o ovócito.

A reserva ovárica é constituída por folículos primordiais, que consistem num ovócito I rodeado por uma única camada de células pavimentosas, folículos em transição, nos quais o ovócito se encontra rodeado por uma camada de células foliculares pavimentosas misturadas com algumas células da granulosa de forma cúbica, e os folículos primários pequenos, onde o ovócito se encontra rodeado por uma única camada de células da granulosa cúbicas. Estes folículos encontram-se em estado quiescente e possuem um ovócito I, que se encontra parado em dictióteno, na 1ª divisão meiótica.

Quando os folículos são recrutados para iniciar a fase de crescimento, aumentam de tamanho como resultado da proliferação das células da granulosa e do aumento do tamanho do ovócito. São então designados folículos primários grandes e possuem uma única camada de células da granulosa, de forma cúbica, a rodear um ovócito I agora de dimensões maiores.

É pouco depois da iniciação do crescimento folicular, ainda como folículo primário, que se inicia a síntese da zona pelúcida, uma camada de glicoproteínas que envolve directamente o ovócito e o acompanha aquando da ovulação e mesmo na fase seguinte. A sua presença e composição são cruciais para o processo de adesão e penetração do espermatozóide.

Desde a fase de folículo primordial que o conjunto das células da granulosa de cada folículo se encontra envolvido por uma membrana basal que as separa das células do estroma e dos restantes elementos celulares do ovário. Por proliferação das células da granulosa, que progressivamente originam duas ou mais camadas de células, os folículos primários grandes passam a designar-se folículos secundários.

Enquanto que os folículos em crescimento mais pequenos não possuem qualquer vascularização, os folículos secundários passam a ser irrigados por uma ou duas arteríolas que terminam numa rede anastomótica, imediatamente externa à membrana basal. Este facto é fisiologicamente importante, dado que a partir deste ponto o folículo fica directamente exposto a factores que circulam na corrente sanguínea. Do lado externo da

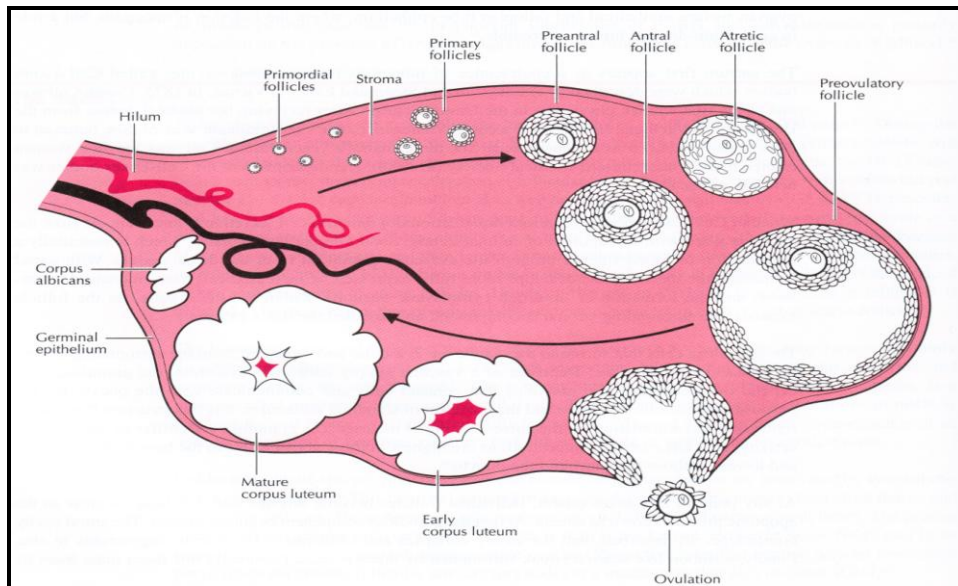
membrana basal, algumas células do estroma ovárico que lhe estão próximas começam a organizar-se numa disposição paralela entre elas, constituindo a camada da teca. À medida que o folículo cresce, essa camada estratifica ainda mais e diferencia-se em duas zonas. A mais externa, a teca externa, possui células muito semelhantes às do estroma ovárico e é rica em fibras de colagénio desempenhando a função de suporte. Na mais interna, a teca interna, as células do tipo fibroblasto assumem a morfologia típica de células secretoras de esteróides. O aparecimento destas duas zonas na camada da teca ocorre apenas quando o folículo possui três a seis camadas de células da granulosa, e é nessa ocasião que os folículos passam a ser designados folículos pré-antrais.

O aparecimento de pequenas cavidades cheias de líquido folicular entre as células da granulosa marcam o aparecimento do antro folicular e nesta fase estamos perante um folículo antral. As células da granulosa que se mantêm a envolver o ovócito designam-se de *cumulus oophorus*.

O líquido folicular é produzido pelas células da granulosa e por difusão com origem nos capilares existentes na camada das células da teca, durante a foliculogénese. Este fluido é semelhante ao plasma sanguíneo na medida em que contém diversas proteínas, anticoagulantes e enzimas, que irão proporcionar ao oócito um microambiente contendo os factores reguladores, tanto parácrinos como endócrinos, necessários para à maturação (Angelucci *et al.*, 2006). Adicionalmente, as células do *cumulus oophorus*, pela sua relação tão íntima e persistente com o ovócito desde o crescimento folicular até ao momento em que a fertilização acontece, decerto influenciam a qualidade e o seu sucesso.

O folículo pré-ovulatório ou de Graaf, é a última fase de desenvolvimento folicular, atingindo 2 a 2,5 cm de diâmetro. O oócito organiza-se de forma concêntrica na camada antral, rodeado por células da granulosa (corona radiata), sendo sustentada por um cordão de células denominadas *cumulus oophorus* (Vander *et al.*, 2001).

Em cada ciclo menstrual é seleccionado apenas um folículo, designado folículo dominante, e é esse que vai ovular. Na fase folicular inicial, não existem diferenças morfológicas evidentes entre o folículo seleccionado e os restantes folículos saudáveis do grupo. Os restantes acabam por desaparecer por atresia (Figura 2).



**Figura 2.** Corte do ovário humano e representação do desenvolvimento folicular (Speroff e Fritz, 2005).

Conclui-se a divisão primária da meiose, com formação do oócito II (em metafase II) e do 1º GP. Na fase final, há ruptura do folículo maduro, com libertação do ovócito, a ser colhido pela extremidade dilatada na trompa de Falópio – Ovulação. Apenas um ovócito é libertado pelo ovário de cada vez. Contudo, em certos casos são libertados dois ou mais e se todos os ovócitos forem fertilizados, haverá uma gestação múltipla com nascimento de gémeos.

Após a ovulação, as células foliculares e as da teca interna dão origem a uma glândula endócrina temporária, denominada corpo lúteo ou amarelo. Este localiza-se na zona cortical do ovário e segrega progesterona e estrogénios, que estimulam a secreção das glândulas da mucosa uterina. Além disso, a progesterona impede o desenvolvimento de novos folículos ováricos (Junqueira e Carneiro, 2008).

O ovário sintetiza e segrega progesterona, androgénios e estrogénios, por um processo denominado esteroidogénese. No ovário, esse processo ocorre nas células da granulosa e da teca. Receptores para a hormona folículo-estimulante (FSH) estão presentes nas células da granulosa e receptores para a LH estão presentes nas células tecais. Assim, sob a acção do LH, as células da teca convertem o colesterol em androgénios, principalmente androstenediona e testosterona. Estes androgénios difundem-se para as

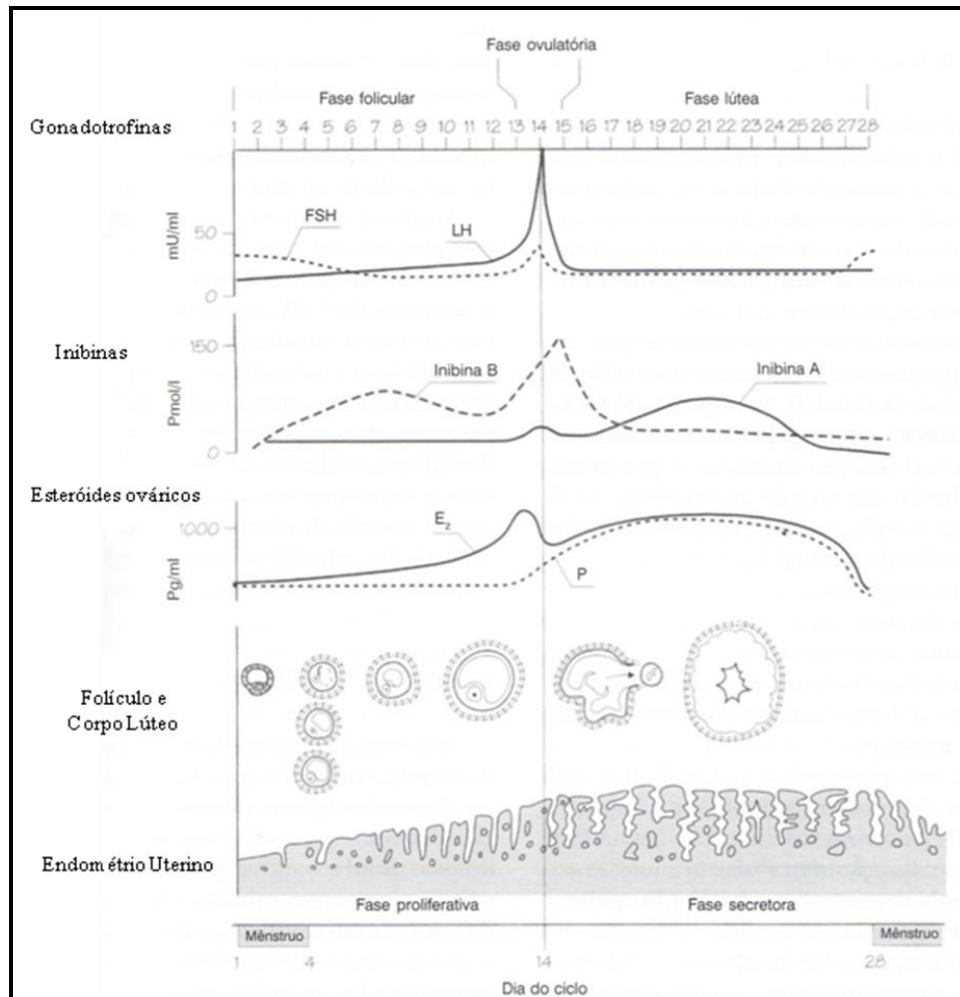
células da granulosa onde, por acção do FSH, são convertidos em estrogénios, principalmente estradiol (Vander *et al.*, 2001).

Paralelamente ao ciclo ovário, ocorre o ciclo uterino, com alterações do endométrio. Essas, induzidas por hormonas ováricas, ocorrem em ciclos de 28 dias. Dividem-se em fase menstrual, proliferativa e secretora. No início de cada ciclo, a maior parte do endométrio sofre descamação pelo processo de menstruação, onde só permanece uma delgada camada de estroma endometrial na base do endométrio original. As únicas células epiteliais remanescentes localizam-se nas porções profundas remanescentes das glândulas e criptas do endométrio. Sob a influência dos estrogénios, segregados em quantidades crescentes pelos folículos ováricos, as células do estroma e, as células epiteliais proliferam-se rapidamente, ou seja, a superfície endometrial é reepitelizada entre 4 a 7 dias após o início da menstruação. Durante as primeiras semanas do ciclo, o útero revitaliza-se com o aumento do número de glândulas e o crescimento dos vasos sanguíneos no endométrio. A fase proliferativa coincide com a última metade da fase folicular do ciclo ovário. Na fase ovulatória, o endométrio apresenta uma espessura de 3 a 4 mm aproximadamente (Junqueiro e Carneiro, 2008).

Na fase secretora, que ocorre após a ovulação, os estrogénios provocam uma ligeira proliferação celular adicional no endométrio, enquanto a progesterona causa um considerável espessamento e desenvolvimento secretor do endométrio. A espessura do endométrio duplica nesta fase, chegando a apresentar valores de 5 a 6 mm (Junqueira e Carneiro, 2008). O objectivo destas alterações endometriais é criar um útero receptivo para o embrião, caso a fertilização ocorra. Se o ócito não for fecundado, os níveis de estradiol e progesterona diminuem consideravelmente. Com este facto, a estimulação endometrial é interrompida e ocorre a ruptura endometrial, desencadeando a menstruação. No período menstrual, libertam-se aproximadamente 40 mL de sangue e 35 mL de líquido seroso. A perda sanguínea cessa entre quatro a sete dias após o início da menstruação e o ciclo endometrial retorna à fase proliferativa (Junqueira e Carneiro, 2008).

Os ciclos ovários e uterinos (Figura 3) estão sob o controle das hormonas da hipófise anterior, FSH e LH. A secreção dessas hormonas é influenciada pela hormona libertadora das gonadotrofinas (GnRH) a partir do hipotálamo, e pelos níveis circulantes de estrogénios e progesterona. A produção de FSH pela hipófise determina o crescimento dos

folículos ovários, iniciando-se a fase folicular. Os folículos ovários produzem, por sua vez, estrogénios, que atingem a sua concentração máxima, 36 horas antes da ovulação. Nesta altura, a progesterona também sofre um aumento, embora ligeiro.



**Figura 3.** Alterações hormonais no ciclo menstrual humano (Heffner, 2001).

Um aumento brusco da concentração da LH e também da FSH determina a ovulação ao 14º dia do ciclo ovário. Durante a fase luteínica, as concentrações de gonadotrofinas tornam-se semelhantes à da fase folicular. A LH estimula o desenvolvimento do corpo amarelo e, consequentemente, a produção de progesterona (é nesta fase que atinge o máximo de concentração). Esta é lançada no sangue, actua sobre o útero, preparando-o para a gestação (Edwards *et al.*, 1995).

De uma forma simples, o hipotálamo estimula a hipófise, que produz LH e FSH. Estas actuam sobre os ovários, desencadeando o ciclo ovário. A evolução dos folículos ovários leva à produção de hormonas sexuais, a progesterona e estrogénios, com acção sobre o útero, provocando as alterações do ciclo uterino. É importante notar, que as hormonas ovárias controlam e condicionam as transformações uterinas. Os estrogénios estimulam o crescimento e proliferação das células do endométrio, e a progesterona a transformação das glândulas e respectivas secreções, bem como, a manutenção da estrutura desenvolvida. Os estrogénios são ainda responsáveis pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários (Vander *et al.*, 2001).

### **1.3 A INFERTILIDADE E A REPRODUÇÃO MEDICAMENTE ASSISTIDA**

Ao procurarmos abordar a vasta problemática da Reprodução Medicamente Assistida (RMA) é necessário começar por recordar de modo adequado dois conceitos fundamentais que, apesar de inúmeras vezes confundidos, apresentam claras e importantes diferenças: Esterilidade e Infertilidade.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define infertilidade como a incapacidade temporária ou permanente de engravidar ou levar uma gravidez até ao seu termo natural após um ano de actividade sexual regular sem utilização de métodos contraceptivos (WHO, 1999).

Aos casais que conseguem conceber naturalmente, mas que, para tal necessitam de um período mais longo, diz-se que apresentam subfertilidade, enquanto que os que apresentam incapacidade total em conceber apresentam esterilidade.

A infertilidade é classificada como primária quando, quer no homem como na mulher, não há história de concepção anterior, mesmo mantendo-se sexualmente activos e sem utilização de métodos contraceptivos. Designa-se como secundária quando o homem, a mulher ou ambos, conceberam anteriormente, mas não o conseguem novamente (Eskandari e Cadieux, 2003).

Na espécie humana as hipóteses de concepção representam apenas 20 a 25% por mês para mulheres com idade inferior a 30 anos (Testart, 1994). Este autor refere ainda que

esta probabilidade diminui para apenas 5% nas mulheres com idades entre os 40 e 45 anos, praticamente anulando-se para idades superiores. Este decréscimo tem sido tradicionalmente atribuído ao progressivo declínio na quantidade e qualidade ovocitária (Bermúdez, 2008). Por outro lado, têm surgido alguns estudos que reportam a influência negativa do avançar da idade na fertilidade masculina, verificando-se que a quantidade e qualidade do esperma estão a diminuir devido a danos na espermatogénese (Eskiocak *et al.*, 2005).

A introdução das técnicas de RMA tornou-se o avanço mais significativo no tratamento da infertilidade, tanto masculina como feminina. Desde o relato da 1ª criança concebida em laboratório (Steptoe e Edwards, 1978), mais de três milhões de crianças foram assim concebidas (Bergh, 2005). Em vários países estas crianças representam já 2 a 4% do total de crianças nascidas (Nyboe-Andersen *et al.*, 2004). Os registos nacionais e internacionais apontam para um aumento gradual das taxas de sucesso.

A OMS reconhece a infertilidade como uma doença que causa enorme sofrimento e dificuldades de realização pessoal, familiar e inserção social. Quando o objectivo do casal passa pela obtenção de uma gravidez e se depara com um resultado negativo mês após mês, isso pode gerar sentimentos de frustração, angústia, ansiedade, culpa, baixa de auto-estima e desilusão, que podem interferir nas relações familiares e sociais, no desempenho profissional e no bem-estar psíquico. Normalmente, a sexualidade do casal também fica afectada, dado que este deixa de sentir satisfação e vê a sua intimidade diminuída, tornando-se apenas num acto com o objectivo de obtenção de uma gravidez.

A incidência da infertilidade é extremamente difícil ou mesmo impossível de estabelecer, quer pelas diferentes definições utilizadas por vários autores, quer pelas variações geográficas e pelas distintas metodologias de avaliação. Contudo, calcula-se que existam à escala europeia cerca de 15% dos casais em idade reprodutiva numa situação de infertilidade (Remohí *et al.*, 2002), sendo que um em cada quatro casais com mais de 35 anos seja infértil. Esta taxa é maior nos países em vias de desenvolvimento, nos quais a existência de doenças com consequências negativas ao nível do aparelho reprodutivo e a falta de recursos em termos de saúde para controlar estes problemas, fazem com que uma proporção considerável da população seja infértil.

Em Portugal, estima-se que a percentagem de casos deve ser similar à incidência Europeia, existindo cerca de trezentos mil casais inférteis (todos os anos surgem, aproximadamente, mais dez mil novos casos), sendo que, para muitos, o recurso às técnicas reprodutivas se apresenta como a única solução. Compreende-se, pois, a importância que têm as técnicas de RMA, uma vez que permitem reavivar a esperança a muitos casais de terem o seu *próprio* filho.

Relativamente à etiologia da infertilidade, esta tanto pode ter origem num dos membros do casal como em ambos. Cerca de um terço dos casos tem sido atribuído a factores masculinos, outro terço a factores femininos, estando o restante relacionado com ambos os elementos do casal (Ludwig, 2003).

### **1.3.1 AS CAUSAS DE INFERTILIDADE**

#### **1.3.1.1 INFERTILIDADE MASCULINA**

A infertilidade no homem pode dever-se a várias situações: azoospermia (ausência de espermatozóides no ejaculado. Pode ser de causa obstrutiva ou secretora), produção insuficiente de espermatozóides (oligozoospermia), anomalias na morfologia (teratozoospermia), problemas na mobilidade (astenozoospermia), presença de gametogénese anormal, incapacidade de fecundar o ovócito ou ausência de ejaculado (aspermia).

As situações referidas anteriormente podem ter causas diversas, tais como: (i) Disfunção erétil; (ii) Problemas endócrinos congénitos (hipopituitarismo, síndrome de Cushing; (iii) Problemas testiculares congénitos ou estruturais, como os casos da síndrome de Klinefelter (indivíduos 47,XXY), trissomia XYY, aplasia das células germinativas; temperatura elevada durante a espermatogénese devido a criptorquidismo; (iv) Problemas testiculares adquiridos devidos a orquite viral, traumatismo, infecção por *Mycoplasma spp.*, exposição a radiações, drogas, álcool, tabaco, antineoplásicos, toxinas ambientais, doenças auto-imunes, doenças sexualmente transmissíveis (DST), doenças sistémicas (cirrose, insuficiência renal, cancro, enfarte do miocárdio, etc.); (v) Presença de leucócitos no esperma; (vi) Disfunções hormonais por secreção reduzida das hormonas LH, FSH e/ou testosterona; (vii) Ejaculação retrógrada em que o esperma se dirige para a bexiga em vez



de se dirigir para o pênis; (viii) Problemas no transporte do esperma, tais com a ausência ou obstrução dos epidídimos e/ou canais deferentes; (ix) Hiperplasia da próstata; (x) Tumores testiculares (Ferraz, 2000).

### **1.3.1.2 INFERTILIDADE FEMININA**

A infertilidade feminina pode ter origem em problemas de anovulação, bloqueio das trompas de Falópio, alterações anatómicas do útero, secreções da vagina e/ou colo do útero hostis para os espermatozóides, interrupção da nidação e idade avançada, entre outros (Eskandari e Cadieux, 2003).

Os problemas acima mencionados podem surgir devido a: (i) Disfunções hormonais (secreção insuficiente de LH e FSH, excesso da produção de prolactina, hipotireoidismo ou utilização de medicamentos à base de esteróides); (ii) Síndrome dos ovários poliquísticos Caracteriza-se pela presença de múltiplos folículos nos ovários, irregularidades do ciclo ovárico, hiperandrogenismo e hirsutismo. Na sua forma mais grave conduz a amenorreia, obesidade e infertilidade; (iii) Endometriose; (iv) Infecções (DST, inflamações causadas pelo uso de contraceptivos como o dispositivo intra-uterino); (v) Malformações congénitas; (vi) Tumores uterinos; (vii) Degeneração prematura do corpo amarelo; (viii) Ovócitos com constituição genética anormal; (ix) Diversas doenças genéticas, auto-imunes, entre outras.

### **1.3.1.3 INFERTILIDADE IDIOPÁTICA**

A infertilidade idiopática ou inexplicada é diagnosticada quando, após uma investigação clínica completa de ambos os parceiros, não foi possível determinar a causa para a infertilidade, estimando-se que ocorra em cerca de 10 a 15% dos casais.

Muitos casos de infertilidade idiopática são provavelmente o resultado de pequenas anomalias na ovulação, função espermática ou desenvolvimento endometrial, para os quais ainda não existem testes adequados (Greenhouse *et al.*, 1998).

Na avaliação da fertilidade deve igualmente tomar-se em consideração que esta pode ser afectada e/ou diminuída em termos individuais por diversos factores relacionados

com o estilo de vida, como sejam a alimentação (a obesidade nas mulheres surge, por vezes, associada à síndrome dos ovários poliquísticos) o estado de saúde geral, o *stress* (o *stress* crónico pode ter consequências nas funções hormonais, que a serem alteradas podem comprometer a ovulação no caso da mulher e a espermatogénese no caso do homem (Pazzini *et al.*, 2007) e a ansiedade.

O tabagismo, a ingestão de álcool, cafeína, contaminantes ambientais e dietas são factores vastamente descritos na literatura (Hruska *et al.*, 2000; Younglai *et al.*, 2005; Homan *et al.*, 2007), como factores promotores de infertilidade.

Desde 1983 que se discute o efeito do consumo do tabaco na fertilidade das populações. No entanto, a maior parte das pesquisas que alertam para a relação do tabagismo com a saúde, são as que dizem respeito às doenças cardiovasculares e ao cancro. Nos estudos realizados sobre as consequências do tabagismo, é de notar que a maioria das mulheres conhece que os efeitos do tabaco causam doenças respiratórias e cancro do pulmão (99% das mulheres), doenças cardíacas (96%) e complicações durante a gravidez (91%). Um número reduzido tem consciência dos riscos específicos para a sua saúde, como a infertilidade (22%), a osteoporose (30%), menopausa precoce (17%), abortamento espontâneo (39%), gravidez ectópica (27%) e cancro do colo do útero (24%) (Roth e Taylor, 2001).

Estes dados confirmam a necessidade de campanhas públicas para esclarecimento das consequências do tabagismo na saúde da mulher

No presente trabalho, será abordado o consumo de tabaco como factor promotor de infertilidade. Este aspecto será focado posteriormente.

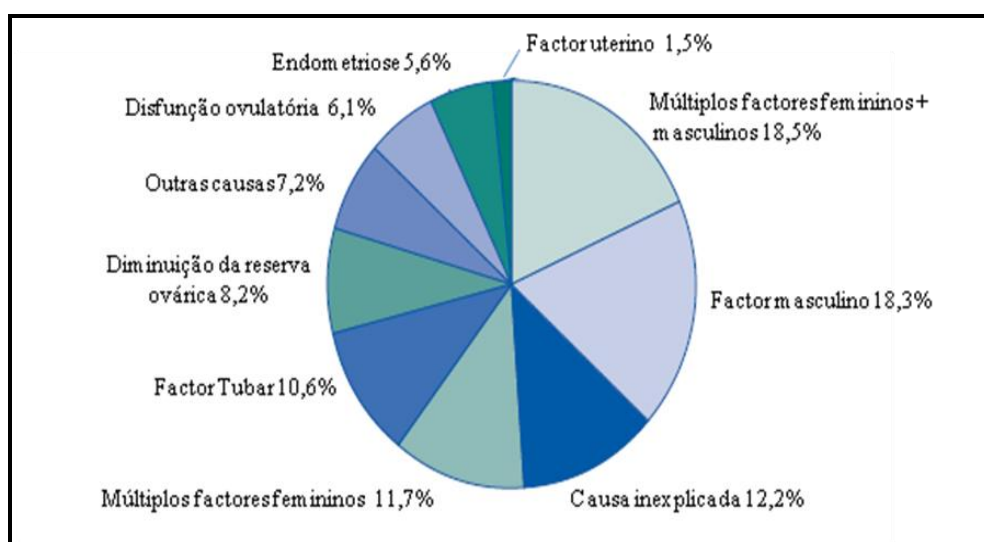
Deve salientar-se, a este propósito, que é extremamente importante compreender a que nível se encontra o problema – estudar o caso concreto de forma a concluir qual a causa, o factor que origina uma situação de patologia associada à esterilidade/infertilidade (saber se se trata de uma causa masculina, feminina, múltipla, ou, eventualmente, desconhecida...) para se poder determinar fundamentalmente a técnica de RMA adequada ao casal em estudo.

### 1.3.2 O TRATAMENTO DA INFERTILIDADE

O casal com alteração da fertilidade deve ser submetido a uma investigação completa para determinar a origem do problema e o tratamento a propor. Alguns dos pontos investigados são a história clínica, familiar, sexual, cirúrgica e social (consumo álcool, tabaco e estupefacientes). Nesta avaliação é também considerado o perfil serológico/vírico, perfil hormonal, hemograma e cariótipo.

No homem podem ainda ser pesquisados os marcadores bioquímicos da funcionalidade das glândulas acessórias (fosfatase alcalina, ácido cítrico e zinco para a próstata; frutose para as vesículas seminais), estudo imunológico (pesquisa de antígenos anti-espermatozóides) e estudo das microdelecções do cromossoma Y. Habitualmente, o espermograma (Anexo 1) constitui o primeiro passo na investigação da infertilidade masculina. Na mulher procede-se à avaliação da cavidade peritoneal, uterina, permeabilidade tubar, avaliação do colo e canal cervical.

A Figura 4 ilustra e resume os diferentes factores de infertilidade em casais inférteis no ano de 2005. O diagnóstico varia entre um factor de infertilidade associado a um dos membros do casal bem como a múltiplos factores igualmente associados a um dos membros do casal ou a ambos.



**Figura 4.** Diferentes causas de infertilidade em casais inférteis, 2005 (adaptado, UDDHHS. 2005).

Os tratamentos disponíveis são múltiplos e devem ser dirigidos às causas ou factores que provocam a infertilidade optando-se por abordagens menos invasivas. Assim, por ordem decrescente, preferencia-se: (i) O tratamento clínico, quando por exemplo se prescrevem indutores da ovulação; (ii) O tratamento cirúrgico para correcção de varicocelo ou hidrocelo no homem e/ou extracção de pólipos, miomas, septos, aderências, endometriomas na mulher; e finalmente (iii) As técnicas laboratoriais de RMA, às quais se recorre quando não é possível corrigir os problemas, uma vez que possibilitam a resolução de algumas situações outrora tidas como invencíveis.

### **1.3.3 AS TÉCNICAS LABORATORIAIS DE REPRODUÇÃO MEDICAMENTE ASSISTIDA**

A partir dos anos 80, começaram a ser implementadas as primeiras práticas em RMA cuja evolução é notória até aos dias de hoje. Em 1978 nasce em Inglaterra, Louise Brown, o primeiro “bebé-proveta”, resultante de 15 anos de esforços de Robert Edwards (biólogo) e Patrick Steptoe (ginecologista).

As técnicas de RMA representam um progresso real na resolução dos problemas de infertilidade. É de salientar que as técnicas de RMA devem ser sempre o método último, só devendo ser utilizadas quando esgotadas todas as formas e meios de se conseguir uma concepção natural. A lei da Assembleia da República nº32/2006 (Anexo 2) inclui nas técnicas de RMA a Fertilização *in vitro* (FIV) e a Injecção Intracitoplasmática de Espermatozóide (ICSI). No artigo 4º, nº 2, a lei impõe como primeira condição da aplicação destas técnicas o diagnóstico de infertilidade, salientando no nº 1 do mesmo artigo que, no seu conjunto, as técnicas de RMA, constituem um método subsidiário e não alternativo, de procriação (Diário da República, 1ª série, Nº 143 – 26 de Julho de 2006).

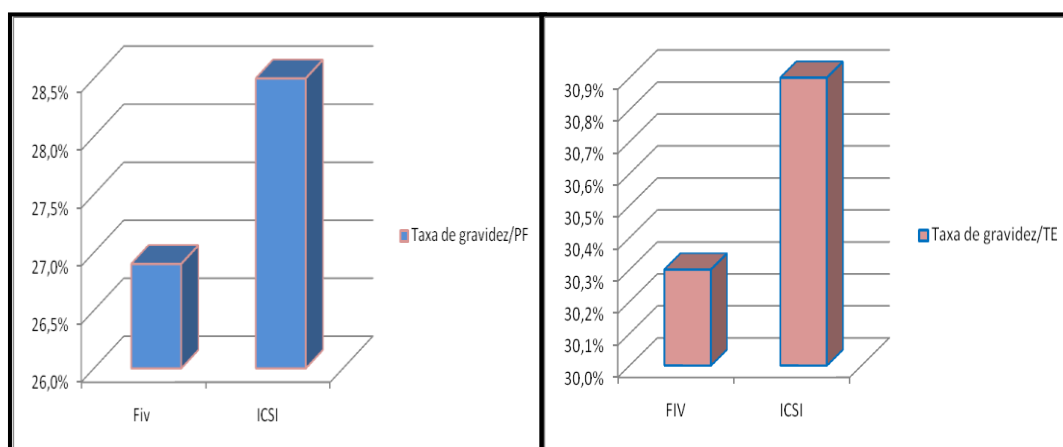
Na FIV, os ovócitos são recolhidos a partir dos ovários, sendo de seguida fecundados com espermatozóides em meio laboratorial. Os embriões assim obtidos são posteriormente transferidos para o útero da mulher.

A fecundação assistida por ICSI consiste na injecção de um único espermatozóide vivo, com mobilidade, no citoplasma do ovócito. Foi desde a publicação do primeiro resultado de gravidez ICSI, em 1992, por Palermo e colaboradores (Palermo *et al.*, 1992)

que a técnica se tornou indicação para casais com factor masculino grave ou em casos onde não se conseguiu fecundação por FIV em ciclos anteriores.

Na literatura científica internacional existem múltiplas referências a diferentes formas de interpretar o sucesso dos tratamentos de RMA.

No registo da *European Society for Human Reproduction and Embriology* (ESHRE) mais recentemente publicado em Fevereiro de 2009 (Figura 5), respeitante ao ano de 2005 e incluindo dados de 30 países em que se realizaram 418.111 ciclos de tratamento as percentagens globais de gravidez por punção folicular (PF) e por transferência de embriões (TE) são descritas. Desta forma, para ciclos FIV obteve-se uma taxa de gravidez por PF de 26,9% e 30,3% de gravidez por TE. Relativamente a ciclos ICSI, as taxas por PF e por TE foram de 28,5% e 30,9% respectivamente (Nyboe-Andersen *et al.*, 2009).



**Figura 5.** Taxa de gravidez por punção e por transferência de embriões consoante a técnica de RMA aplicada.

## 1.4 O TABAGISMO EM PORTUGAL E POLÍTICAS DE PREVENÇÃO

O tabagismo, ou seja o hábito de fumar, é considerado pela OMS a principal causa evitável de doença e morte prematura, sobretudo nos países desenvolvidos.

Estima-se que em Portugal ocorram cerca de 8500 óbitos por ano devido ao tabagismo. Não obstante dos seus efeitos demolidores, fumar é um comportamento muito difundido no mundo inteiro e também em Portugal. Segundo dados do Inquérito Nacional de Saúde de 1999, estima-se que fumem diariamente cerca de 29,3% dos homens e cerca de 7,9% das mulheres com mais de 15 anos, o que corresponde a um total de 1 626 597 portugueses fumadores (1 248 212 homens e 378 385 mulheres). Este valor pode estar subestimado, dado que, segundo o *Eurobarómetro*, fumavam diariamente em 2000, em Portugal, cerca de 44,0% dos homens e 14,0% das mulheres (Commission Européene, 2003, citado em Macedo e Precioso, 2004).

Em Portugal, o tabaco terá sido responsável em 1995, pela morte de cerca de 8300 fumadores (7800 homens e 500 mulheres), conforme se pode ver na Tabela 1, ou seja, 23 pessoas por dia (Macedo e Precioso, 2004).

<b>Tabela 1.</b> Estimativa do número de mortes por várias causas atribuídas ao tabaco em Portugal e por faixa etária (1995).							
	<b>Homens</b>			<b>Mulheres</b>			
	<b>35-69</b>	<b>+ 70</b>	<b>Total</b>	<b>35-69</b>	<b>+ 70</b>	<b>Total</b>	<b>Total</b>
<b>Cancro do pulmão</b>	1 100	900	2 000	100	000	100	2 100
<b>Todos os cancros</b>	1 900	1 500	3 400	100	100	200	3 600
<b>Vasculares</b>	800	900	1 700	100	100	200	1 900
<b>Respiratórias</b>	400	1 000	1 400	000	100	100	1 500
<b>Outras</b>	900	500	1 400	100	000	100	1 500
<b>Todas as causas</b>	4 000	3 800	7 800	200	300	500	8 300

Em Portugal, em 2006, deu-se o primeiro passo *Governamental* na luta contra o tabagismo passivo através da proposta de lei n.º 401/2006. Com base nesta proposta de Lei, foi promulgada a lei que entrou em vigor no dia 1 de Janeiro de 2008 - Lei n.º 37/2007 de 14 de Agosto (Anexo 3). Esta lei contempla a proibição do consumo do tabaco nos locais de trabalho e recintos públicos fechados ou quase fechados, mas abre excepções! Uma lei

sem exceções seria “a medida que mais poderia contribuir para a desnormalização do tabaco na sociedade, pois a dinâmica assim criada motivaria os fumadores a reduzir o consumo do tabaco ou deixar de fumar, desincentivando os jovens de começar a fazê-lo” (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2007b).

#### 1.4.1 COMPONENTES DO FUMO DO TABACO PREJUDICIAIS À SAÚDE

O fumo do tabaco é um aerossol constituído por partículas sólidas e líquidas (componentes voláteis) em suspensão numa mistura gasosa (Macedo e Precioso, 2004). O fumo do tabaco é um verdadeiro *cocktail* de tóxicos, pois contém mais de 4000 substâncias, das quais várias dezenas são conhecidas pelo seu carácter cancerígeno e muitas outras pelo seu efeito tóxico para o organismo. Destacam-se quatro substâncias por serem altamente prejudiciais: a nicotina, o alcatrão, o CO e as substâncias irritantes (Macedo e Precioso, 2004). A nicotina é o principal alcalóide presente nas folhas da planta do tabaco e é reconhecida por gerar dependência fisiológica. A nicotina está também associada à alteração do ritmo cardíaco, da tensão arterial, e do aumento da capacidade de coagulação do sangue. Todas estas alterações no organismo deixam o sujeito que inala o fumo produzido pelo tabaco com uma maior predisposição a enfartes e trombooses (Ambrose e Barua, 2004).

O alcatrão é uma mistura heterogénea de várias substâncias que se conseguiu demonstrar serem muito prejudiciais para a saúde (Macedo e Precioso, 2004), pois são substâncias que por si mesmas têm a capacidade para gerar células cancerígenas (Pestana e Mendes, 1999, citado em Macedo e Precioso, 2004). De entre essas substâncias é possível destacar os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (como por exemplo o alfa-benzopireno) e as nitrosaminas (Melero, *et al.*, 1997, citado em Macedo e Precioso, 2004).

O CO é um gás incolor altamente tóxico produzido pela combustão do tabaco e do papel que envolve o cigarro. A sua principal função nefasta sobre o organismo é fazer com que o aporte de O<sub>2</sub> aos diferentes órgãos diminua drasticamente (o CO tem uma afinidade com a hemoglobina 240 vezes superior ao O<sub>2</sub>).

As principais substâncias irritantes presentes no fumo do tabaco são os fenóis, a acroleína, o amoníaco, os aldeídos e o ácido cianídrico (Macedo e Precioso, 2004). Devido à capacidade que estas substâncias têm de alterar a funcionalidade dos mecanismos de protecção e limpeza das vias aéreas (através da redução da mobilidade dos cílios vibráteis e da conversão do epitélio ciliado em não ciliado), vai originar à pessoa exposta ao fumo do tabaco uma maior susceptibilidade a infecções respiratórias. Para além deste quarteto venenoso, no fumo do tabaco podemos encontrar outros cancerígenos, produtos radioactivos, cianeto de hidrogénio, pesticida e metais.

#### **1.4.2 O FUMO AMBIENTAL DO TABACO E SUAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

O fumo ambiental do tabaco (FAT) também conhecido como fumo passivo ou fumo em segunda mão, é uma mistura de gases e partículas em estado sólido ou líquido, libertadas para o ar quando algum tipo de tabaco está a ser fumado (cigarros, cigarrilhas, charuto, etc). Às pessoas que inalam este tipo de fumo designamos fumadores passivos ou fumadores involuntários. Um fumador activo obrigatoriamente também se torna num fumador passivo (USDHH, 2006).

Estudos recentes demonstram que a combustão dos produtos contidos no tabaco leva à formação de milhares de minúsculas partículas sólidas e líquidas suspensas numa mistura de gases. O FAT é composto por mais de 4000 substâncias (USDHHS, 2006), muitas delas tóxicas e outras cancerígenas (alguma delas estão apresentadas no Anexo 4).

Durante a combustão de um cigarro formam-se três correntes de fumo: a corrente primária, que corresponde ao fumo que é inalado pelo fumador, sendo ele a principal fonte de exposição; a corrente secundária, que corresponde ao fumo desprendido pela extremidade acesa do cigarro (a uma temperatura de cerca de 835°C), e a corrente terciária, que está relacionada como o fumo libertado pelo fumador após a aspiração (CEPA: Air Resources Board, 2005).



#### 1.4.2.1 A CORRENTE DO FUMO TERCIÁRIA

A contaminação do ar em ambientes fechados é resultado da corrente do fumo terciária. Tal como referido, corresponde ao fumo exalado pelo fumador após ter interagido com os seus pulmões. As alterações da composição da corrente primária ocorrem nos pulmões como resultado da absorção de alguns constituintes pelo tecido pulmonar, assim como pela evaporação, diluição do ar e coagulação de partículas. Quando é exalado pelo fumador (corrente terciária) já tem uma composição mais atenuada.

Quando o fumador inspira pelo filtro de um cigarro, o fluxo de ar criado por essa inspiração vai fazer com que a temperatura dos gases contidos no fumo do tabaco alcance os 850°C na extremidade do cigarro e a temperatura das partículas alcance os 800°C (Jenkins *et al.*, citado em CEPA: Air Resources Board, 2005).

Tanto os gases como as partículas formadas pela combustão do tabaco vão arrefecendo à medida que atravessam a coluna do tabaco e a zona do filtro. A composição química do tabaco contido na coluna do tabaco vai arrefecendo à medida que os depósitos da combustão do tabaco vão sendo sujeitos à decomposição e se vão acumulando na coluna do tabaco. Irá resultar como consequência deste processo, a formação de alguns constituintes químicos que inicialmente não estavam presentes originalmente na folha da planta do tabaco (Ogden e Jenkins, 1999, citado em CEPA: Air Resources Board, 2005).

#### 1.4.2.2 A CORRENTE DO FUMO SECUNDÁRIA

A corrente secundária corresponde ao fumo que é libertado da ponta de um cigarro aceso, e entre as inalações que o fumador realiza. Normalmente, é produzido a temperaturas mais reduzidas (entre os 600°C).

A corrente de fumo secundária é gerada a temperaturas mais baixas e em condições de pH e fluxos de ar diferentes, e por esse motivo contém concentrações mais elevadas de substâncias tóxicas e carcinogénicas quando comparadas com a corrente de fumo primária. Esta corrente secundária constitui a principal causa da poluição do ar em ambientes fechados (USDHHS, 2006; CEPA: Air Resources Board, 2005).

### **1.4.2.3 DIFERENÇAS NA COMPOSIÇÃO ENTRE O FUMO DA CORRENTE TERCIÁRIA E SECUNDÁRIA**

O resultado do relatório de 1986 da U.S. – NRC (*Unites States Nuclear Regulatory Commission*) indica que as emissões de alguns componentes do fumo da corrente secundária contêm valores de contaminantes 10 vezes superiores comparativamente com os valores dos componentes emitidos pelo fumo da corrente terciária (Anexo 5). Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são um exemplo disso mesmo (CEPA: Air Resources Board, 2005). O fumo da corrente secundária poderá ser mais tóxico por unidade de massa do que o fumo da corrente terciária e apresenta-se, assim, como o que mais contribui para a formação do FAT (U.S.EPA, 1992, citado em CEPA: Air Resources Board, 2005).

Alguns estudos indicam que as emissões por unidade de massa do fumo da corrente secundária são relativamente constantes entre os vários tipos de tabaco comercializados (U.S.EPA, 1992; Jenkins *et al.*, 2000; Lodovic *et al.*, 2004; Leader and Hammond, 1991, citados em CEPA: Air Resources Board, 2005).

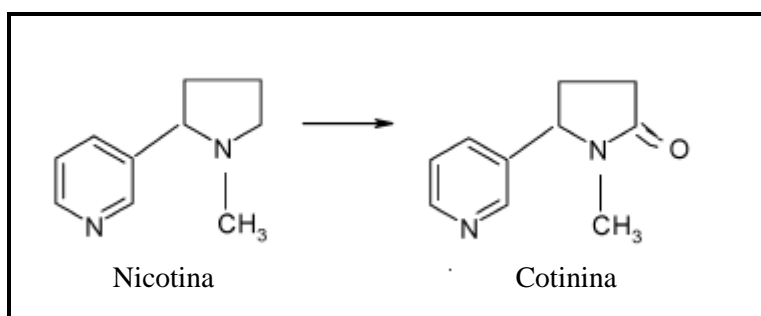
### **1.4.3 BIOMARCADORES DA EXPOSIÇÃO AO FUMO DO TABACO**

O recurso a uma biomarcador é essencial para quantificar a exposição sistemática de indivíduos não fumadores a ambientes com fumo. O método ideal para a análise desta exposição é a determinação da sua concentração em fluidos corporais num indivíduo exposto (Benowitz, 1999). De acordo com Jaakkola e Jaakkola (1997), uma marcador ideal para quantificar o fumo ambiental deverá ter as seguintes características: 1) Ser específico da combustão do fumo; 2) Apresentar uma meia-vida no corpo longa; 3) Estar relacionado quantitativamente com o grau de exposição ambiental; 4) Ser o agente associado aos problemas de saúde ou estar forte e consistentemente ligado a ele; 5) Ser detectado em quantidades pequenas e com bastante precisão; 6) Ser encontrado em amostras que não necessitem de procedimentos invasivos e 7) Apresentar baixo custo.

Diversos testes bioquímicos foram já avaliados para quantificar a presença de fumo no organismo de um indivíduo. Entre eles, está o tiocianato, medido na saliva e no plasma,

e o CO, medido através da sua ligação a hemácias na forma de carboxihemoglobina. Contudo, estudos demonstram que tais parâmetros não são adequados, devido à sua pouca especificidade e sensibilidade (Oddoze *et al.*, 1999).

A nicotina proveniente do fumo do tabaco é extremamente solúvel em água, o que facilita a sua libertação através do aparelho respiratório (Benowitz, 1996). Quando um indivíduo se encontra exposto ao FAT, a nicotina entra para os pulmões, é absorvida para a corrente sanguínea circulando por vários órgãos entre os quais os rins e o fígado. Cerca de 70% a 80% da nicotina é metabolizada no fígado. O principal metabolito produzido pela nicotina é a cotinina, um metabolito inactivo, catalisado por enzimas pertencentes ao complexo citocromo P450 (Figura 6), como CYP2A6 que hoje em dia é conhecido como a principal nicotina C-Oxidase. Porém, existem outras isoenzimas P450, incluindo a CYP2B6 e CYP2D6 que realizam a mesma função de catalisar a oxidação da nicotina para formar a cotinina (Benowitz, 1996).



**Figura 6.** Via de transformação da nicotina em cotinina através do complexo citocromo P450 (adaptado Velloso *et al.*, 2007).

Cerca de 10 a 15% da cotinina é excretada pelos rins enquanto que a restante é convertida noutro tipo de metabolitos, principalmente, em cotinina glucoronida, trans-3-hidroxicotinina glucoronida (Benowitz, 1996).

A nicotina existe na forma gasosa no FAT e na forma particulada na corrente principal do tabaco. A meia-vida da nicotina em fluidos corporais é apenas de cerca de uma hora e o pH urinário pode ficar alterado em cerca de 14 vezes em relação ao nível

basal. Saliente-se o facto de muitos alimentos, como o tomate, a batata, a couve-flor, assim como o chá-preto, possuírem pequenas quantidades de nicotina (Scherer e Richer, 1997).

A cotinina está presente no sangue de fumadores em concentrações muito maiores que a nicotina e mantém-se por mais tempo na corrente sanguínea. Este metabolito pode ser encontrado na urina, na saliva, no muco cervical, no líquido amniótico, no leite materno e pode ser determinado na urina, saliva, no sangue e no cabelo.

Segundo Jaakkola e Jaakkola (1997), a meia-vida da cotinina, em crianças, varia entre 32 e 82 horas. Este metabolito é um produto detectável exclusivamente *in vivo* e é específico para o tabaco. Os níveis de cotinina reflectem bem a quantidade de nicotina absorvida através do fumo ambiental (Benowitz, 1996).

A concentração de cotinina no soro reflecte os seus níveis noutros fluidos biológicos que têm boa correlação entre si. Pela facilidade de recolha, pelo carácter não invasivo e pelo custo mais acessível da análise, a urina é o material mais escolhido para fazer os doseamentos deste metabolito. Os níveis de cotinina nos fumadores passivos são, em geral, de 1% a 8% dos níveis encontrados nos fumadores activos.

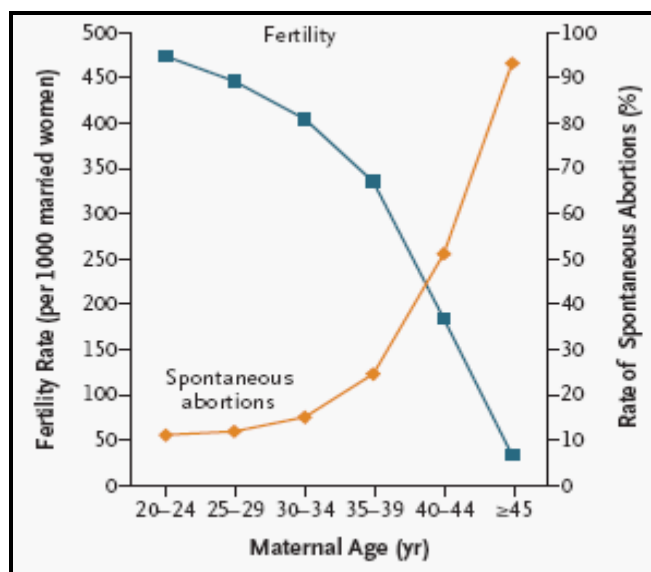
Nas crianças, os níveis de cotinina urinários aumentam proporcionalmente ao número de pessoas fumadoras em casa. Dell'orco e colaboradores (1995) estudaram 346 crianças e demonstraram que a exposição destas ao fumo do tabaco ambiental é também um indicador importante da exposição passiva ao fumo, pois elas apresentam níveis de cotinina mais elevados dos que observados em crianças não expostas.

A cotinina pode ser determinada por diversas técnicas, como o imunoensaio enzimático, radioimunoensaio, e cromatografia em espectrometria. Os métodos de cromatografia e radioimunoensaio são mais sensíveis, contudo, necessitam de aparelhos complexos nem sempre acessíveis (Etzel, 1990).

## 1.5 O TABACO, A INFERTILIDADE E A REPRODUÇÃO MEDICAMENTE ASSISTIDA

Nos últimos anos, a comunidade científica tem demonstrado um interesse crescente, através da publicação de vários estudos epidemiológicos e experimentais, à cerca da possível associação entre factores ambientais e a saúde reprodutiva humana.

Já no desenvolvimento intra-uterino, o feto feminino desenvolve folículos germinativos, milhares de folículos primordiais que permanecem no ovário até ao início da sua libertação, que ocorre na idade reprodutiva da mulher. Da menarca até à menopausa, o número de ovócitos diminui por apoptose assim como a qualidade ovocitária pelo aumento de alterações genéticas dos mesmos. A diminuição da fertilidade (Figura 7) é observada clinicamente por volta dos 35 anos, quando se verifica um aumento da incidência de abortamentos espontâneos e de aneuploidias (Heffner, 2004).



**Figura 7.** Taxas de fertilidade e abortamento espontâneo em função da idade materna (Heffner, 2004).

Kaplan e colaboradores (2005) acompanharam 1000 casais verificando em quanto tempo as mulheres conseguiam engravidar, sendo este conceito definido por Curtis e colaboradores (1997), como o número de ciclos menstruais que a mulher necessitou para atingir a concepção, tendo relações sexuais frequentes, sem o uso de qualquer método

anticoncepcional. Neste mesmo estudo, 71% das mulheres com idade inferior a 30 anos, engravidaram num período de três meses, enquanto apenas 41% das mulheres com idade superior a 36 anos conseguiram engravidar no mesmo período, evidenciando que a diminuição da fertilidade está intimamente relacionada com o avanço da idade feminina.

Um estudo canadiano avaliou o declínio da fecundidade em 2607 casais inférteis, sendo esta definida como a probabilidade mensal de atingir concepção. O estudo avaliou simultaneamente o tabagismo, o consumo de cafeína e a ingestão de álcool, no período de 1991 e 1992. Concluiu-se que o cigarro está associado à queda de fecundidade nos homens e nas mulheres e ainda, que a fecundidade diminui com o aumento do número de cigarros fumados por dia pelas mulheres (Curtis *et al.*, 1997).

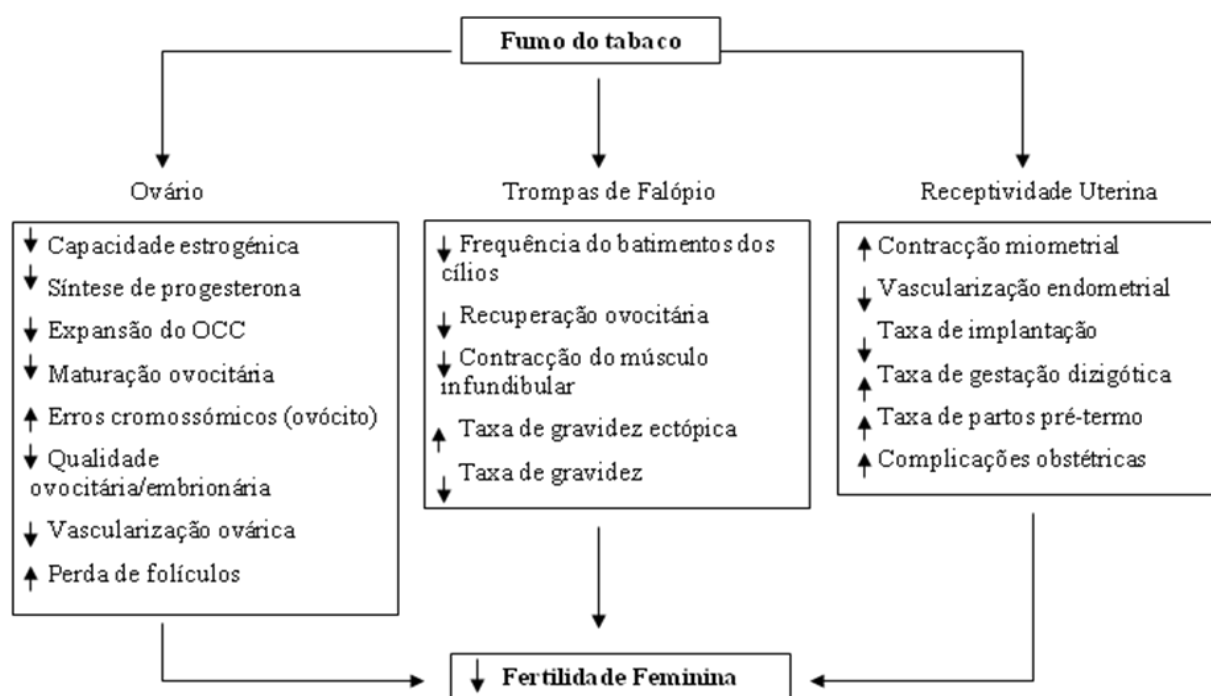
Bolumar e colaboradores (1996) estudaram a relação entre o tempo necessário para engravidar e o consumo do cigarro. Foram incluídas mulheres entre os 23 e 44 anos, de uma amostra populacional de nove países da Europa, das quais 3187 mulheres planeavam engravidar e 4035 já se encontravam grávidas (63 gestações com mais de 20 semanas). A principal conclusão deste trabalho foi a forte associação encontrada entre o consumo de mais de metade de um maço de cigarros por dia e a redução da fertilidade.

Paszkowski e colaboradores (2002) levantaram uma hipótese para o modo de acção do cigarro na foliculogénese. Afirmaram que o cigarro afecta o balanço oxidativo no folículo pré-ovulatório, através do *stress* oxidativo intrafolicular. Nas mulheres, os compostos químicos do cigarro podem afectar o desenvolvimento folicular e alterar níveis hormonais na fase luteínica. A cotinina, produto do metabolismo da nicotina, e o cádmio foram detectados no líquido folicular de mulheres fumadoras, reforçando esta hipótese. Além disso, estas mulheres tendem a entrar na menopausa 1 a 4 anos mais cedo do que as não fumadoras (Younglai *et al.*, 2005)

Num estudo mais recente, foi avaliado o tabagismo, o índice de massa corporal (IMC) e o sucesso das técnicas de RMA. Este estudo contemplou 8454 das mulheres que se submeteram a tratamentos de RMA pela primeira vez e que fumavam mais de um cigarro por dia há mais de um ano. Concluiu-se que quer o consumo do cigarro como o excesso de peso comprometem as taxas de nados vivos na fertilização *in vitro* e que as mulheres fumadoras têm taxas de abortamento significativamente mais elevadas, quando

comparadas com as não fumadoras. O trabalho sugere ainda, que casais inférteis melhorariam os resultados dos tratamentos de RMA se mudassem o seu estilo de vida (Lintsen *et al.*, 2005).

Ao longo dos anos, vários estudos vieram reiterar consistentemente que o tabaco diminui a fertilidade e em particular a fertilidade feminina, pela alteração que os seus compostos químicos exercem sobre os órgãos envolvidos em todo o processo de fecundação (Figura 8).



**Figura 8.** Mecanismos através dos quais o fumo do tabaco emitido por um cigarro afecta a função reprodutiva feminina (adaptado Soares e Melo, 2008).

O tecido ovárico tem sido amplamente estudado no que respeita à exposição aos compostos do tabaco. A fertilidade depende da capacidade que os ovários têm de produzir um folículo maduro, capaz de libertar um ovócito a ser fertilizado. O complexo processo folicular e maturação ovocitária podem ser influenciados por numerosos factores endógenos e exógenos. A literatura médica indica que a exposição a químicos sintéticos da população pode sofrer consequências reprodutivas e que essa exposição pode contribuir para a subfecundidade, infertilidade, abortamento precoce e falência ovárica (Practice Committee of the American Society for reproductive Medicine, 2004).

Não há dúvida que o mecanismo do tabagismo na fertilidade feminina é bastante complexo. Os componentes do cigarro inibem a aromatase das células da granulosa resultando uma diminuição da concentração de estrogénios na corrente sanguínea, por um lado, e por outro um aumento dos níveis de FSH. Outro efeito tóxico é a depleção das células germinativas. Zenzes (2000) observou a existência de alterações no DNA das células ováricas e embriões de fumadoras, sugerindo o risco potencial de lesão nuclear, como alterações cromossómicas numéricas e estruturais, além das consequências causadas na proliferação e invasão trofoblástica (Charles *et al.*, 2000).

Shiverick e Salafia (1999) mostraram que o tabagismo tem interferência na função das células da granulosa luteinizadas resultando uma alteração no corpo lúteo, explicando o provável mecanismo da maior taxa de aborto precoce em fumadoras.

A maturação ovocitária requer uma adequada vascularização dos ovários garantindo uma correcta oxigenação e nutrição. O factor A de crescimento endotelial (VEGF-A) é produzido pelas células da teca e granulosa, regularizando a vascularização durante o desenvolvimento folicular. O seu efeito é mediado por dois receptores transmembranares, VEGFR-1 e VEGFR-2. Quando o VEGF-A está ligado à forma solúvel do receptor (sVEGFR-1), ocorre uma redução da bioactividade do VEGF-A, diminuindo o efeito de angiogénese e vascularização. Deste modo, o sVEGFR-1 actua como um antagonista. Motejlek e colaboradores (2006), mostraram que as fumadoras apresentam uma concentração significativamente maior ( $P<0,05$ ) do receptor 1 solúvel do factor de crescimento vascular endotelial no líquido folicular (499,6 pg/ml *versus* 159,2 pg/ml, respectivamente) que as não fumadoras, resultando numa diminuição da vascularização ovárica e consequentemente uma redução da maturação ovocitária.

Soares e colaboradores (2008) numa recente publicação defenderam igualmente o possível efeito deletério dos compostos do fumo do tabaco especificamente no processo de maturação dos folículos ovárico. Verificaram que este efeito se traduzia em piores resultados nos parâmetros de fertilização *in vitro*, em mulheres com hábitos tabágicos, comparativamente a mulheres não fumadoras.



Talbot e Riveless (2005) demonstraram a influência da nicotina na frequência dos batimentos dos cílios da trompa, na recuperação ovocitária e nas contracções do músculo liso na região infundibular das próprias trompas de Falópio. Estas modificações poderão alterar o transporte de gâmetas e embriões, conduzindo a uma redução de fecundidade. O atraso no transporte dos embriões poderá diminuir a viabilidade dos próprios embriões e/ou aumentar a frequência da ocorrência de gestações ectópicas. Por outro lado, a implantação poderá também estar comprometida pelo acelerar do transporte dos embriões e pela entrada prematura dos embriões no útero.

Em resumo, certas existem relativamente à associação entre os hábitos tabágicos e as alterações verificadas no aspecto fisiológico das trompas, determinando um acelerar ou retardar da progressão de blastocistos para a cavidade uterina bem como alterações no sistema imunitário que poderá contribuir para uma associação epidemiológica entre o fumar e o decréscimo de fecundidade devido a factores tubares.

Apesar de muitos estudos revelarem a associação entre o fumo do cigarro e a função ovárica, só muito recentemente a sua influência na receptividade uterina foi ganhando mais consistência.

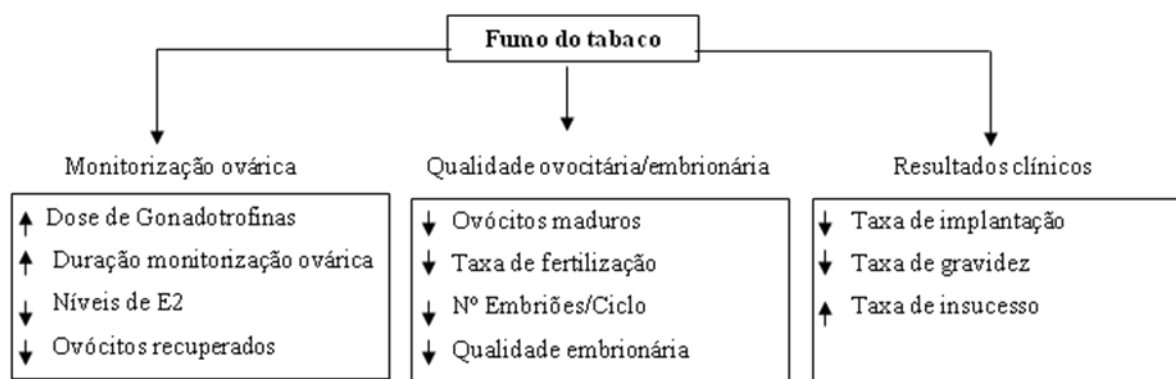
Soares e colaboradores (2007) num estudo retrospectivo analisaram 785 ciclos de doação de ovócitos entre Janeiro de 2002 e Junho de 2005 determinando a associação entre o hábito tabágico da receptora de ovócitos e o sucesso do ciclo de RMA. A informação sobre os hábitos tabágicos do cônjuge e da dadora, foram classificadas como variáveis controlo, bem como as idades da dadora e receptora, o IMC da receptora e o número e qualidade dos embriões transferidos. A taxa de gravidez em mulheres não fumadoras foi significativamente superior quando comparada com as fumadoras (52,2% *versus* 34,1%, respectivamente). A taxa de implantação foi também superior no grupo das não fumadoras (32,2% *versus* 25,8%), diferença esta não significativa. Surpreendentemente, a taxa de gestação múltipla foi significativamente superior no grupo das mulheres fumadoras (60,0% *versus* 31,0%).

Com foi referido anteriormente, a literatura no que respeita à associação do fumo do cigarro e a função uterina é escassa. Apesar disso, o conhecimento do efeito dos seus

constituintes na fisiologia ovárica poderá ser um dado essencial para compreender os mecanismos através dos quais estas substâncias alteram a receptividade uterina.

Quando extrapolamos todos estes mecanismos para o ambiente uterino as possíveis consequências sobre o endométrio e o embrião são fáceis de imaginar.

Segundo Soares e Melo (2008) no que diz respeito aos tratamentos da RMA, estes são menos eficazes nas fumadoras pelas seguintes razões: (i) São necessárias maiores doses de gonadotrofinas necessárias para a estimulação ovárica; (ii) Diminuição do pico de estradiol; (iii) Aumento dos ciclos cancelados; (iv) Diminuição da taxa de implantação; (v) Aumento da falha de ciclos de fertilização; (vi) A idade e o tabaco têm efeito sinérgico na depleção dos ovócitos; (vii) Aumento da ocorrência de gestações ectópicas, reflectido nas alterações sobre os cílios das trompas de Falópio; (viii) Aumento da incidência de gestações gemelares (Figura 9).



**Figura 9.** Alteração nos parâmetros de fertilização *in vitro* resultantes da exposição das mulheres ao fumo do tabaco (adaptado Soares e Melo, 2008).

Várias têm sido as equipas de investigadores que têm estudado a influência do fumo do tabaco na RMA. Apresentam-se como exemplo, mais alguns estudos pré-clínicos.

Shiloh e colaboradores (2004) correlacionaram o impacto do fumo do cigarro na espessura da zona pelúcida de ovócitos e embriões, antes de serem transferidos para a cavidade uterina. Englobou uma amostra de 169 mulheres, 31 fumadoras com cônjuges não fumadores, 44 fumadoras, com cônjuges também fumadores, 65 fumadoras passivas

em que apenas os cônjuges fumavam e 29 mulheres não fumadoras com cônjuges igualmente não fumadores. A zona pelúcida foi analisada em 903 ovócitos e em 436 embriões. A espessura da zona pelúcida dos ovócitos e embriões em mulheres fumadoras activas e passivas mostrou-se significativamente mais espessa do que a das mulheres não fumadoras. Este facto sugere que os espermatozóides possam apresentar uma maior dificuldade em fecundar ovócitos de mulheres fumadoras.

O estudo de Neal e colaboradores (2005) envolveu 225 mulheres sujeitas a tratamentos de infertilidade numa clínica de reprodução no Canadá nos anos de 2003 a 2004, demonstrando uma diminuição da taxa de implantação e gravidez em mulheres fumadoras activas e passivas em comparação com mulheres não fumadoras. Contudo, o tabagismo passivo entre as mulheres foi apenas avaliado por intermédio de um questionário.

Um outro trabalho com 300 mulheres não fumadoras da Califórnia envolveu um programa de acompanhamento pré-natal, onde se verificou uma associação entre os níveis de cotinina no soro materno e o aumento da incidência de mortes fetais assim como baixo peso dos nascituros (Kharrazi *et al.*, 2004).

Por fim, um estudo epidemiológico de Klonoff-Cohen e colaboradores (2001) confirmaram que 38% de mulheres não fumadoras concebem no primeiro ciclo comparado com 28% de mulheres fumadoras. A probabilidade de uma fumadora necessitar de mais de uma ano para engravidar é 3,4 vezes maior que as não fumadoras. Cada ano que a mulher fuma está associado a um aumento de 9% de risco de insucesso nos tratamentos de RMA (CI 1,02-1,15;  $P < 0,05$ ) e comparativamente com as não fumadoras, apresentam o dobro do risco de insucesso.

## 1.6 ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS

O presente estudo foi projectado, como objectivo principal, para investigar a influência do fumo do tabaco no sucesso das técnicas de Reprodução Medicamente Assistida.

A presente dissertação foi baseada num estudo prospectivo, e teve ainda os seguintes objectivos específicos:

1. Determinar a presença de cotinina no líquido folicular e relacioná-la com a exposição ao fumo do tabaco.
2. Avaliar a influência da exposição das mulheres ao fumo do tabaco nos diferentes parâmetros laboratoriais do processo de Fertilização *In Vitro* nomeadamente: no número de ovócitos recuperados, taxa de fertilização, e na percentagem de embriões de qualidade transferidos.
3. Avaliar o sucesso das técnicas de Reprodução Medicamente Assistida traduzido nas taxas de gravidez clínica e de implantação alcançadas.

## 2.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

O presente estudo foi realizado no Centro de Estudo e Tratamento de Infertilidade (CETI) Porto e no Centro Hospitalar Vila Nova de Gaia/Espinho EPE, entre Novembro de 2007 e Novembro de 2008. Envolveu um total de 258 casais da consulta de infertilidade que realizaram tratamento de Reprodução Medicamente Assistida (RMA).

Após a recolha da história clínica e exames completos de diagnóstico, determinou-se a causa de infertilidade: (i) Factor tubar; (ii) Factor ovulatório; (iii) Endometriose; (iv) Factor uterino (v) Factor masculino isolado; (vi) Múltiplos factores sem masculino; (vii) Múltiplos factores com masculino; (viii) Factor idiopático. Com base na história clínica e diagnóstico de infertilidade foi estabelecida a decisão para tratamento de RMA e técnica a aplicar: Fertilização *In Vitro* (FIV) ou Injecção Intracitoplasmática de Espermatozóide (ICSI), de acordo com as normas ou orientações então vigentes.

Foram estabelecidos critérios de exclusão de forma a evitar interferências de algumas variáveis que pudessem influenciar os resultados em análise. Salientam-se os seguintes:

(i) **Idade das mulheres igual ou superior a 37 anos.** Quando se aplicam técnicas de RMA, o avançar da idade relaciona-se com a diminuição das taxas de gravidez e implantação, razão pela qual se estabeleceu esta idade como limite máximo (Terriou *et al.*, 2001; Ziebe *et al.*, 2001).

(ii) Ciclos em que após o estudo do casal infértil o factor de infertilidade foi identificado como **endometriose, factor masculino isolado e múltiplos factores femininos com masculino**, uma vez que as taxas de sucesso das técnicas são fortemente limitadas e variáveis em função destes factores.

A endometriose caracteriza-se pela presença de tecido endometrial noutros locais que não a revestir o interior da cavidade uterina, podendo surgir na cavidade abdominal, trompas e/ou ovários. Este tecido endometrial ectópico responde às alterações hormonais do ciclo ovárico, pelo que menstrua no seu local de implantação, causando dor e desconforto. Na sua forma mais severa, associa-se à presença de adesões junto às trompas e ovários, interferindo com a ovulação e transporte do ovócito. Embora as técnicas de

RMA sejam uma mais valia para o tratamento de infertilidade, a endometriose parece ter um efeito negativo nas taxas de sucesso (Simón *et al.*, 1994, Barnhart *et al.*, 2002).

A infertilidade de causa masculina merece também alguma atenção. Embora a ICSI tenha vindo revolucionar o tratamento dos casos masculinos, existem testes que evidenciam que os espermatozóides morfollogicamente normais e móveis podem apresentar níveis altos de fragmentação de DNA, e assim influenciar os resultados dos tratamentos de RMA (Benchai *et al.*, 2003; Larson-Cook *et al.*, 2003).

(iii) **Ciclos em que a terapêutica para indução da ovulação se realizou após dessensibilização pituitária, através de protocolos com agonistas da hormona libertadora de gonodotrofina (GnRH) (Suprefact<sup>®</sup>, Hoeport, Portugal) ou com antagonistas da GnRH (Cetrotide<sup>®</sup>, Serono, Portugal ou Orgalutran<sup>®</sup>, Organon, Portugal), seguida de estimulação ovárica com FSH purificada exógena (Menopur<sup>®</sup>, Ferring, Portugal).** Durante o processo de tratamento uma das etapas principais é a estimulação controlada dos ovários. O objectivo da estimulação em RMA, consiste em induzir o desenvolvimento de um número mínimo de ovócitos de elevada qualidade, de modo a garantir a possibilidade de transferência de um ou dois embriões de óptima qualidade. Porém, verifica-se que diferentes protocolos de estimulação podem conduzir a resultados diferentes (eg: taxas de gravidez distintas), sugerindo que a estimulação pode afectar o desenvolvimento ovocitário (Olivennes e Frydman, 1998; Drakakis *et al.*, 2005). Diversos estudos sugerem ainda que a estimulação controlada dos ovários pode alterar a comunicação entre as células do *cumulus* e o ovócito provocando um atraso ou até mesmo pausa na maturação (Krisher, 2004).

Pelas razões atrás referidas, foram seleccionados para o estudo, casais em que foi aplicada a mesma terapêutica para a indução da ovulação, optando-se pela administração com antagonistas da GnRH (Cetrotide<sup>®</sup>, Serono, Portugal ou Orgalutran<sup>®</sup>, Organon, Portugal), seguida de estimulação ovárica com FSH recombinante exógena (Gonal F<sup>®</sup>, Serono, Portugal ou Puregon<sup>®</sup>, Organon, Portugal). Este método é rotineiramente utilizado.

(iv) **Ciclos sem transferência embrionária (TE).** Neste trabalho pretendeu-se calcular as taxas de sucesso dos tratamentos de RMA por transferência de embriões. Assim, foram apenas seleccionados os ciclos em que foi realizada a TE.

(vi) **Ciclos com transferência embrionária ao 4º dia de desenvolvimento.** Optou-se por excluir ciclos em que a TE se realizou na fase de mórula, devido ao número reduzido de casos sem significado estatístico.

(vii) **Ciclos com colheita de espermatozóides por biópsia testicular (TESE - *Testicular Sperm Extraction*).** A TESE é uma técnica de incisão cirúrgica do escroto e túnica albugínea do testículo, na tentativa de obtenção de espermatozóides a partir da polpa testicular extraída. Quando esta técnica é realizada com êxito, o tratamento de RMA finda com a ICSI. As taxas de sucesso são superiores quando se recorre a inseminação de espermatozóides do ejaculado e a fresco (Nyboe-Andersen *et al.*, 2009).

(viii) **Ciclos com transferência de embriões criopreservados (TEC).** Dado o tratamento de infertilidade num ciclo de RMA poderão resultar, de forma imprevisível, embriões supranumerários que necessitam de ser criopreservados. É importante salientar que de um modo geral, a transferência de embriões a fresco conduz a uma taxa de gravidez mais elevada do que a TEC (Nyboe-Andersen *et al.*, 2009).

(ix) **Ciclos de casais reincidentes.** Quando um casal realizou mais do que um ciclo em estudo, foi considerado apenas o primeiro tratamento.

## 2.2 ASPECTOS ÉTICOS

Os casais foram esclarecidos verbalmente e por escrito sobre as etapas do estudo e o termo de consentimento informado foi assinado no dia da punção folicular (PF) por ambos os membros, ficando arquivado no processo clínico.

Foi garantido aos casais a total liberdade para desistir da inclusão no estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento. A participação foi voluntária, anónima, e não interferiu no tratamento de RMA.

Os casais não tiveram despesas adicionais, nem compensação financeira por participarem no presente estudo.

### 2.3 PROTOCOLO CLÍNICO DE ESTIMULAÇÃO OVÁRICA

A estimulação controlada dos ovários, é uma etapa crucial nos tratamentos de RMA cujo objectivo consiste na obtenção de vários folículos, ovócitos e, consequentemente seleccionar embriões que apresentem uma maior probabilidade de implantar de forma a conseguir taxas de sucesso favoráveis após transferência.

A primeira fase do tratamento assentou numa manipulação medicamentosa do eixo hipotálamo/hipófise/gónadas, com vista à obtenção de um número razoável de ovócitos para posterior fecundação (Carvalho *et al.*, 1999).

O recrutamento folicular iniciou-se com injeções de gonadotrofinas, FSH recombinantes exógenas, sintetizadas por engenharia genética (Gonal F®, Serono, Portugal; Puregon®, Organon, Portugal), a fim de se desenvolverem vários folículos.

As gonadotrofinas foram administradas diariamente, por via subcutânea, a partir do 2º/3º dia do ciclo menstrual. As doses variaram de 50 a 300 UI/dia na maioria das mulheres. O controlo ultrasonográfico transvaginal do desenvolvimento folicular foi realizado em intervalos de cerca de 48 horas, visando adequar a quantidade administrada consoante a resposta ovária.

A estimulação foi ainda coadjuvada com a administração de antagonistas da GnRH (Orgalutran®, Organon, Portugal e Cetrotide®, Serono, Portugal). Estes ligam-se imediatamente aos receptores da GnRH, causando inibição da sua acção de forma competitiva e diminuição dos níveis séricos de LH e FSH. A inibição da LH é mais acentuada que a da FSH, provavelmente pelas diferentes formas de regulação da secreção destas hormonas e pelas suas características bioquímicas distintas. A sua administração foi efectuada diariamente, a partir do 6º/7º dia do ciclo, de acordo com as dimensões foliculares.

Conseguido um número de dois a três folículos dominantes com dimensões adequadas (17-18 mm), foi administrada uma injeção de 10.000 UI/L de hormona gonadotrófica coriónica humana (hCG) (Pregnyl®, Organon, Portugal) que simula o pico



da LH, necessária para a maturação final dos ovócitos. Esta intervenção foi realizada 34 a 36 horas antes da PF.

## **2.4 PROTOCOLO DE PUNÇÃO FOLICULAR**

Os folículos foram aspirados com seringa, após a administração da hCG, por punção ecoguiada por ultrasonografia transvaginal, com uma agulha metálica (CDD Labortories, Paris, França). Todos os folículos presentes foram puncionados sob anestesia.

O líquido folicular, no qual se encontravam os ovócitos, foi aspirado para seringas de 20 ml (Terumo®, Portugal), contendo 1 ml de PBS (Solução de Tampão fosfato, Alfagene®, Portugal) e processado num estêreo microscópio (Smz-u, Nikon Corporation, Japão), em placas de petri (Nunc®, Dinamarca) previamente aquecidas a 37°C.

Os ovócitos foram isolados e lavados em SPM (Sperm Preparation Medium, without phenol red, MediCult®, Dinamarca), sendo depois transferidos para uma placa de cultura de 4 poços (Nunc®, Dinamarca), contendo 700 µl de meio IVF<sup>TM</sup> (*In Vitro* Fertilisation media, MediCult®, Dinamarca) e colocados em estufa (Heracell 150, Heraeus, Alemanha) a 37°C sob atmosfera húmida a 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

Todos os procedimentos de manuseamento de ovócitos e embriões foram realizados em câmara de fluxo laminar vertical (Heraeus; Herasafe HS 12).

## **2.5 SELECÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES EM AMOSTRA DE ESPERMA PARA TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO MEDICAMENTE ASSISTIDA**

O esperma foi colhido por masturbação para um frasco estéril e após a sua liquefacção, procedeu-se à avaliação no microscópio óptico (Labophote, Nikon Corporation, Japão), da concentração, mobilidade e morfologia dos espermatozóides segundo os critérios da OMS (World Health Organization, 1999).

Preparam-se dois gradientes de densidade de partículas de sílica – 80% e 55% – (Supra Sperm System, with phenol red, MediCult®, Dinamarca) em tubos cónicos de centrífuga (Nunc®, Dinamarca), sobre o qual se adicionou a amostra de sémen. Após centrifugação a 600G durante 15 minutos rejeitou-se o sobrenadante.

Ressuspendeu-se o *pellet* em novo tubo, onde se procedeu a duas lavagens sucessivas com SPM por centrifugações a 300G durante 10 minutos. Após a recolha do *pellet*, adicionou-se SPM, e incubou-se na estufa a 37°C, sob atmosfera húmida a 5% de CO<sub>2</sub>, de forma a que os espermatozóides de melhor qualidade ascendessem à superfície pela técnica de *swim-up*. Com este procedimento seleccionaram-se os espermatozóides a usar nas técnicas de RMA.

## 2.6 AS TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO MEDICAMENTE ASSISTIDA

### 2.6.1 FIV

Os ovócitos, depois de lavados em SPM foram colocados numa placa de 4 poços em meio IVF<sup>TM</sup> e colocados na estufa a 37°C, sob atmosfera húmida a 5% de CO<sub>2</sub>. Cerca de aproximadamente 4 horas da PF os ovócitos foram inseminados com um total de 100.000/ml de espermatozóides móveis em 0,7 ml de meio IVF<sup>TM</sup> em placa de 4 poços (Nunc®, Dinamarca).

### 2.6.2 ICSI

Após incubação dos ovócitos durante 3 a 6 horas em estufa a 37°C sob atmosfera húmida a 5% de CO<sub>2</sub>, estes foram desnudados através da remoção das células do complexo cumulus-corona antes da fecundação, quer por acção enzimática, tendo sido colocados cerca de 20 segundos em Hyadase (Synvitro Hyadase; MediCult®, Dinamarca), quer por acção mecânica com auxílio de uma pipeta de desnudação (Swemed®, Suécia). Após sucessivas lavagens em SPM, a fim de retirar o excesso de enzima, os ovócitos foram transferidos novamente para a estufa.

A ICSI, propriamente dita, foi realizada a 37°C num microscópio invertido (Diaphot, Nikon Corporation, Japão), com uma ampliação de 400x, usando uma óptica Hoffman, Nikon Diaphot de contraste de fase e um conjunto de dois micromanipuladores de controlo remoto (Joystick Hydraulic Micromanipulador – MO – 188, Narishige) e dois micro-injectores (IM-6, Narishige). No seguimento desta técnica, os espermatozóides foram colocados em meio viscoso, polivinilpirrolidona (PVP, Medicult®, Dinamarca). A imobilização completa desses gâmetas foi efectuada com uma pipeta de micro-injecção (Swemed®, Suécia), por pressão realizada na região média da cauda do espermatozóide contra o fundo da placa, até que esta formasse um ângulo (Palermo *et al.*, 1996). Em seguida, o espermatozóide foi lentamente aspirado pela cauda, num processo facilitado pelo uso de um circuito de óleo mineral, ao qual a agulha se encontrava ligada.

Com o glóbulo polar (GP) posicionado às 12 horas, procedeu-se à penetração na zona pelúcida e oolema com a pipeta de injecção (posicionada nas 3 horas). Foi aspirado um pouco de ooplasma para melhor envolver o espermatozóide, que depois foi deixado no interior da célula. A pipeta de injecção foi depois retirada lenta e cuidadosamente.

O ovócito foi libertado da pipeta *holding* (Swemed®, Suécia) e transferido para um meio ISM1<sup>TM</sup> (Culture medium, MediCult®, Dinamarca).

## 2.7 AVALIAÇÃO DA FECUNDAÇÃO E DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Cerca de 16 a 22 horas (D+1) pós inseminação, e no caso de ciclos FIV, os ovócitos, foram desnudados de forma a remover as células da granulosa.

A verificação da fecundação no dia 1 foi efectuada no mesmo microscópio invertido utilizado para realização da ICSI, numa ampliação de 200x, pela presença de dois pronúcleos (PN), masculino e feminino, e extrusão do 2º GP.

A cultura dos zigotos com fecundação normal foi realizada individualmente em gotas de 20 µl de meio ISM1<sup>TM</sup> sob parafina pré-aquecida (MediCult®, Dinamarca) a 37°C, em atmosfera húmida com 5% CO<sub>2</sub> para o 1º e 2º dias. Estas gotas foram numeradas, e cada número correspondeu a um zigoto/embrião em todos os procedimentos.

A avaliação ao 2º dia foi realizada 44 a 47 horas (D+2) e ao 3º dia 67 a 71 horas (D+3) após FIV/ICSI. No 2º dia, foram usados critérios para decidir o dia da transferência, tal como o número e qualidade dos embriões obtidos, idade da mulher, factores de infertilidade e número prévio de tratamentos. Este sistema foi empregue rotineiramente durante o período em estudo. Os embriões considerados de boa qualidade que não foram transferidos, foram criopreservados ao 2º ou 3º dias de cultura, após consentimento informado do casal.

No caso de cultura prolongada dos embriões até ao 5º dia (D+5), procedeu-se à renovação do meio de cultura para ISM2<sup>TM</sup> (Culture medium, MediCult®, Dinamarca), também disposto em gotas 20 µl, onde os embriões completaram o seu desenvolvimento até à altura da transferência.

## 2.8 CLASSIFICAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA

Aquando da transferência de embriões é importante considerar o número ideal a transferir. Sabe-se que as possibilidades de gravidez aumentam numa proporção directa com o número de embriões transferidos, no entanto, eleva-se a probabilidade da ocorrência de gestações múltiplas, tradicionalmente associadas a uma maior mortalidade fetal e materna. A decisão sobre o número de embriões a serem transferidos deve ter em consideração diversos factores, tais como a idade da mulher, a qualidade dos embriões, o historial clínico do casal, a existência de um programa de criopreservação de embriões e a vontade do casal infértil (Traveres, 1992; Junior *et al.*, 1997).

Um dos principais objectivos das unidades de RMA é evitar a taxa de gravidez múltipla sem diminuir a taxa de sucesso (Wittermer *et al.*, 2000). Assim, transferir apenas um embrião representa o último avanço, existindo já muitos estudos dedicados à escolha do “melhor embrião” (Vilska *et al.*, 1999; Gerris *et al.*, 1999; Wittermer *et al.*, 2000; Van Royen *et al.*, 2001).

Na literatura têm sido descritos diferentes critérios para a selecção de embriões. Actualmente, a avaliação dos embriões é baseada predominantemente em aspectos morfológicos não-invasivos. No entanto, têm sido propostas um número variado de

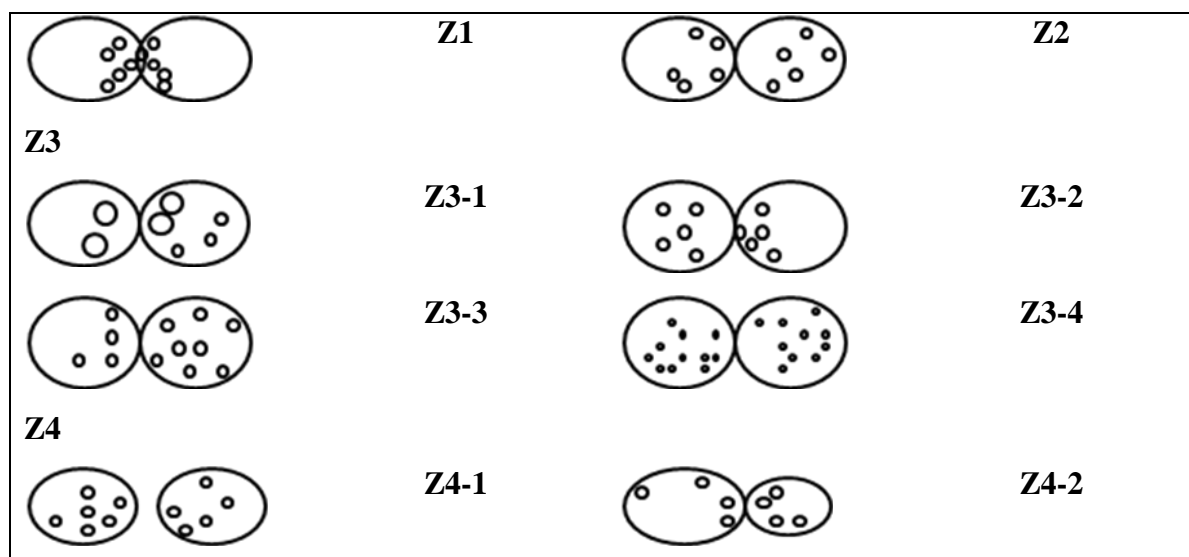
características: taxa de divisão (Ziebe *et al.*, 1997; Vilska *et al.*, 1999; Rienzi *et al.*, 2005), divisão precoce (Sakkas *et al.*, 1998; Rienzi *et al.*, 2005), tamanho dos blastómeros (Ziebe *et al.*, 1997; Rienzi *et al.*, 2005), extensão da fragmentação (Alikani, *et al.*, 1999; Vilska *et al.*, 1999), distribuição dos fragmentos (Alikani *et al.*, 1999; Rienzi *et al.*, 2005) e estado de nucleação (Pelink *et al.*, 1998; Rienzi *et al.*, 2005).

O sistema de classificação de zigotos proposto por Scott e colaboradores (2000), amplamente comprovado, foi usado neste estudo. Baseia-se na dimensão e simetria dos PN, dimensão, número e igualdade dos corpos precursores de nucléolos (CPN).

Scott e colaboradores (2000) classificaram os zigotos em quatro grupos de acordo com a morfologia pronuclear: **Z1** - número e tamanho igual de CPN alinhados em ambos os PN na junção pronuclear; **Z2** - número e tamanho igual de CPN dispersos em ambos os PN; **Z3** - desigualdade do número ou alinhamento dos CPN nos 2 PN; **Z4** - PN de tamanho desiguais (Z4-1) ou afastados (Z4-2) (Figura 10). O número absoluto de CPN em cada PN varia entre três a sete.

Dentro do grupo Z3 consideram-se ainda os subgrupos Z3-1 (um a três CPN de grandes dimensões, alinhados e geralmente na zona de junção dos PN num dos PN e vários CPN dispersos no outro PN); Z3-2 (CPN alinhados na zona de junção dos PN num dos PN e CPN dispersos no outro PN); Z3-3 (CPN de número e tamanho diferente entre os dois PN, sem alinhamento na zona de junção dos PN); e Z3-4 (presença de vários CPN de pequeno tamanho em ambos os PN).

Já o grupo Z4 subdivide-se no subgrupo Z4-1 (PN afastados) e Z4-2 (PN com mais de 4 µm de diferença de tamanho).



**Figura 10.** Classificação pronuclear proposto por Scott e colaboradores (2002).

O grau morfológico usado para classificar os embriões ao 2º e 3º dias de desenvolvimento, foi baseado nos critérios Espanhóis da Associação para o Estudo da Biologia e da Reprodução (ASEBIR), sendo os seguintes (Cuadros *et al.*, 2007): 1) Número de células e ritmo de divisão; 2) Percentagem e tipo de fragmentação celular; 3) Desigualdade no tamanho dos blastômeros; 4) Contorno do blastômero; 5) Visualização de núcleos e grau de multinucleação (presença de dois ou mais núcleos numa célula); 6) Presença de vacúolos; 7) Aparência da zona pelúcida; 8) Grau de compactação; 9) *Pitting* (granulosidade homogeneamente distribuída pelo citoplasma, considerada um factor de bom prognóstico). Desta forma, os embriões foram classificados em graus A, B, C e D, sendo o A e o B considerados como melhores embriões (Tabela 2): **Grau A** – Embrião de óptima qualidade com a máxima capacidade de implantação; **Grau B** – Embrião de boa qualidade com elevada capacidade de implantação; **Grau C** – Embrião regular, com uma probabilidade de implantação média; **Grau D** – Embrião de má qualidade, com uma probabilidade de implantação baixa.

As diferentes observações de um mesmo embrião podem aportar informações relevantes no momento de decisão do embrião a transferir. A categorização da qualidade embrionária deve realizar-se através de múltiplas observações, ao longo do desenvolvimento embrionário.

Tabela 2. Atribuição da qualidade embrionária em função das diferentes variáveis consideradas.							
Grau	Dia TE	Nº células (→ Indica a progressão D+2 para D+3)	% Fragmentação	Semelhança de tamanho*	Multinucleação	Citoplasma	Zona Pelúcida
A	D+2	4	≤ 10% Sem fragmentos tipo IV	Iguais ou semelhantes	Não	Sem vacúolos	Normal
	D+3	4 → 7-8					
B	D+2	2 ou 5** 4 (sem fragmentação 11%-25%)	≤ 25% Sem fragmentos tipo IV				
	D+3	4 → 7-8 (sem fragmentação 11%- 25%) 4 → ≥9 2 ou 5 → ≥7					
* A semelhança ou igualdade entre os blastómeros só é valorizada nos estádios de 2,4,8, e 16 células; ** Com preferência de 5 células							
Grau	Dia TE	Nº células (→ Indica a progressão D+2 para D+3)	% Fragmentação	Multinucleação	Citoplasma	Sempre que exista	
C	D+2	2, 4 ou 5 (sem fragmentação 26%-35%) 3* ou 6	≤ 35% Sem fragmentos tipo IV	Não	Não ou escassos	- Desigualdade no tamanho celular	
	D+3	2, 4 ou 5 → ≥ 7 (sem fragmentação 26%-35%) 6 → ≥ 8 2 ou 4 → 6 3* → ≥ 6				- Escassos vacúolos  - Zona pelúcida não normal sem eclosão assistida***	
D	D+2	1 ou > 6 3 (células semelhantes)				- Multinucleação - Vacúolos abundantes - Fragmentação > 35% - Fragmentação tipo IV - Halo citoplasmático D+3	
	D+3	1 ou > 6 → qualquer valor Qualquer valor → < 6 Aumento de 1 célula D+2 para D+3					
* 1 célula grande e 2 pequenas; ** Com preferência a 6 células; *** Se a única alteração é a zona pelúcida não normal, considera-se um embrião de qualidade C. Se se realiza eclosão assistida passa a qualidade B.							

A imagem embrionária definida como *normal* considera os blastómeros com forma ovóide, de igual dimensão e sem fragmentações citoplasmáticas.

A presença de uma elevada percentagem de fragmentos mostrou prejudicar o desenvolvimento dos embriões, ao contrário da existência de fragmentos pequenos e espaçados que parecem não afectar significativamente o potencial de implantação. Contudo, o tipo de fragmentação é difícil de avaliar uma vez que estas estruturas não são estacionárias, podendo desaparecer por lise durante a cultura (Antckak *et al.*, 1999; Van Royen *et al.*, 2001).

A avaliação deste parâmetro é aplicado quer a D+2, quer a D+3, podendo constituir-se quatro graus de qualidade embrionária: 10% de fragmentação (Figura 11); 11-25% de fragmentação (Figura 12); 26-35% de fragmentação; >35% de fragmentação

(Figura 13A) e fragmentação tipo IV (Figura 13B) com o predomínio de fragmentos de grande tamanho que inclusive podem confundir-se com células de pequeno tamanho, repartindo-se por quase todo o embrião.



**Figura 11.** Embriões de 4 a 8 blastómeros com 10% de fragmentações.



**Figura 12.** Embriões com cerca de 11-25 % de fragmentação.



**Figura 13.** **A** – Embrião com fragmentação > 35%; **B** – Embrião com fragmentação tipo IV

Ao 5º dia de desenvolvimento (112 a 140 horas pós inseminação), os blastocistos foram seleccionados para transferência se apresentassem blastocélio (ou o início da sua formação), assim como uma trofoectoderme bem definida com um número suficiente de células, de modo a formar uma camada contínua (Scott *et al.*, 2000). Foram constituídas dois graus de qualidade dos blastocistos, A e B de acordo com Cuadros e colaboradores (2007) (Tabela 3).



A cultura prolongada não melhora a qualidade embrionária mas poderá ter indicação para pacientes que respondam bem à estimulação ovocitária e que possuam mais de três embriões de oito células e boa morfologia ao 3º dia (Michelmann e Gilbhard, 2003).

<b>Tabela 3.</b> Designação da qualidade de blastocistos em função das diferentes variáveis consideradas.					
<b>Grau</b>	<b>Dia TE</b>	<b>MCI</b>	<b>Tamanho MCI*</b>	<b>Trofoectoderme</b>	<b>Grau de expansão**</b>
<b>A</b>	D+5	Oval e compactada	$3800 \mu\text{m}^2 - 1900 \mu\text{m}^2$	Epitélio homogéneo; Células elípticas	O blastocélio a ocupar todo o volume do embrião
<b>B</b>	D+5	Oval e compactada	$3800 \mu\text{m}^2 - 1900 \mu\text{m}^2$	Epitélio irregular	
* $3800 \mu\text{m}^2$ é comparável ao tamanho de um blastómero de um embrião no estadio de 4 células; ** Blastocisto colapsado: é um mecanismo natural que tem lugar no estadio de blastocisto e que, se ocorre.					

## 2.9 TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA E ANÁLISE DE GRAVIDEZ

A TE foi realizada com a mulher em posição de litotomia, sem recurso a anestesia ou sedação, com um cateter maleável (SydneyCook®, Austrália) para atravessar o canal cervical, permitindo que os embriões fossem depositados directamente na cavidade uterina. Os embriões foram transferidos em meio UTM (Transfer medium, MediCult®, Dinamarca) segundo o procedimento meio – ar – meio com embriões - ar - meio. A TE foi efectuada ao 2º dia, ao 3º dia ou 5º dia.

Após a transferência procedeu-se à verificação do cateter quanto à presença de embriões possivelmente retidos. As pacientes ficaram em repouso aproximadamente uma hora.

A TE foi sempre realizada na fase luteínica. Com vista à manutenção desta fase, foram administrados comprimidos vaginais de progesterona micronizada de 200 mg, de 8 em 8 horas, (Utrogestan, Jaba®, Portugal), a partir do dia da PF e, pelo menos, até à 12ª semana, se apropriado.

A gravidez foi confirmada pelo aumento de Subunidade  $\beta$  Gonadotrofina Coriónica Humana ( $\beta$ - hCG) no soro, ao 16º dia (duas semanas após PF) e a gravidez clínica foi estabelecida por ultra-sonografia às seis semanas de gestação, pela presença de saco gestacional com embriocárdio positivo na cavidade uterina.

## **2.10 PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO FUMO DO TABACO NOS DIFERENTES PARÂMETROS DO PROGRAMA DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO***

### **2.10.1 AVALIAÇÃO DOS HÁBITOS TABÁGICOS DOS CASAIS PELO MÉTODO DE ENTREVISTA E CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO**

Através do método de entrevista estruturada, que se apresenta em anexo (Anexo 6), e por questionamento oral, recolheram-se informações sobre os hábitos tabágicos das mulheres, garantindo-se o anonimato e a confidencialidade das mesmas.

Para o presente estudo foram constituídos três grupos: **Grupo de mulheres não fumadoras (NF)**, que incluiu mulheres não fumadoras, cujos cônjuges não revelaram hábitos tabágicos e que no decorrer da entrevista não relataram qualquer exposição ao fumo ambiental do tabaco (FAT); **Grupo de mulheres fumadoras passivas (FP)**, que compreendeu mulheres não fumadoras cujo cônjuge é fumador e/ou se encontram expostas ao FAT quer no domicílio quer no local de trabalho; **Grupo de mulheres fumadoras activas (FA)**, em que as mulheres afirmaram consumir pelo menos um cigarro por dia.

Tal como descrito por Zenzes e colaboradores (1997), o grupo FA foi subdividido em dois novos grupos: As mulheres afirmaram consumir menos de dez cigarros por dia foram categorizadas como fumadoras activas ligeiras (**FAL**) e as que fumavam dez cigarros por dia ou mais, como fumadoras activas moderadas (**FAM**).

Por fim, é de salientar que intensidade de exposição ao FAT no grupo FP, cuja origem advém do facto do cônjuge ser fumador, foi avaliada da seguinte forma: exposição leve, quando o cônjuge fuma menos de dez cigarros por dia; Exposição moderada, quando o cônjuge fuma mais de dez cigarros e menos de vinte por dia; Exposição forte, quando o consumo de cigarros por dia ultrapassa os vinte.

### **2.10.2 ISOLAMENTO DAS AMOSTRAS DE LÍQUIDO FOLICULAR**

No presente estudo, para o doseamento de cotinina, foi utilizado o líquido folicular proveniente da aspiração do primeiro folículo mais acessível e de diâmetro superior a 17 mm (valor calculado através de três medições) para que a amostra estivesse o menos contaminada de células sanguíneas.

Após centrifugação (centrífuga Heraeus Labofuge 400, Certilab®, Portugal) a 2500g em tubos cónicos (Nunc®, Dinamarca), durante 5 minutos, o sobrenadante foi isolado em criotubos (Nunc®, Dinamarca) com cerca de 0,5 ml por tubo e criopreservado a -20°C.

### **2.10.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COTININA NO LÍQUIDO FOLICULAR PELO MÉTODO BIOQUÍMICO ELISA**

A cotinina, um dos principais metabolitos da nicotina, foi quantificada no líquido folicular pelo método *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). A cotinina é conhecida por se acumular nos fluidos corporais proporcionalmente ao número de cigarros consumidos por dia e é frequentemente usada para confirmar os hábitos tabágicos dos casais (Zenzes, 1996). Desta forma, utilizou-se um Kit comercial (BioQuant, Ann Arbor, MI), baseado num imunoensaio competitivo para o doseamento quantitativo de cotinina nas amostras de líquido folicular, tal como descrito por Motejlek e colaboradores (2006).

Os doseamentos realizaram-se de acordo com o protocolo inerente ao fabricante, procedendo-se à quantificação da intensidade da reacção pela leitura das absorvâncias em duplicado num comprimento de onda de 450 nm utilizando um espectrofotómetro de placas (Tek Instruments Inc., PowerWave XS, Winooski, EUA).

## 2.11 VARIÁVEIS ESTUDADAS NO PROGRAMA DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

Os resultados obtidos nos tratamentos de RMA foram inseridos numa base de dados do programa File Maker Pro 4 *Data base*.

O número de ovócitos recuperados correspondeu ao número total de ovócitos obtidos na PF, e o número médio de ovócitos recuperados por casal ao número total de ovócitos recuperados, dividido pelo número de casais.

A taxa de fertilização foi calculada como a razão entre o número de ovócitos fertilizados e o número de ovócitos inseminados. O número de ovócitos fertilizados foi definido como o número de ovócitos que fertilizaram, originando um zigoto com a visualização de dois GP e dois PN. O número de ovócitos inseminados para FIV correspondeu ao número total de ovócitos recuperados, enquanto para ICSI correspondeu ao número total de ovócitos em metafase II aquando da microinjecção.

A percentagem de embriões de alta qualidade foi baseada nos critérios de Cuadros e colaboradores (2007) e foi traduzida na razão entre o número de embriões de grau A e B e o número total de embriões transferidos (independentemente da sua qualidade).

A taxa de gravidez clínica foi definida como a razão entre o número de gestações com observação de saco gestacional intrauterino com actividade cardíaca fetal aproximadamente seis semanas após PF e o número total de transferências. Por fim, a taxa de implantação foi definida como a razão entre o número total de sacos gestacionais observados e o número total de embriões transferidos.

## **2.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas com o programa SigmaStat (versão 3.5 para Windows). As proporções observadas entre grupos foram comparadas através do teste de Qui-Quadrado. A comparação das médias entre dois grupos foi realizada com o teste t-Student, tendo sido utilizado o teste alternativo não paramétrico Mann-Whitney quando se verificou que os dados não apresentavam uma distribuição normal. A comparação das médias entre três grupos foi feita através da análise de variâncias (ANOVA), tendo sido utilizado o teste alternativo não paramétrico Kruskal-Wallis no caso em que se verificou a violação da normalidade. As diferenças foram consideradas significativas para um erro tipo I ( $\alpha$ ) inferior a 0,05.

### 3.1 POPULAÇÃO EM ESTUDO

O presente estudo refere-se a 258 casais, dos quais apenas 232 realizaram transferência embrionária (TE). As razões de ter havido casais sem TE devem-se à falha de fertilização ( $n=13$ ), falha de colheita de ovócitos ( $n=6$ ) ou espermatozóides ( $n=1$ ), má qualidade embrionária ( $n=2$ ), imaturidade ovocitária ( $n=3$ ) ou criopreservação de todos os embriões ( $n=1$ ).

No período a que se refere o presente estudo foram realizados 271 ciclos. Nos casais em que foi realizado mais do que um ciclo, considerou-se apenas o primeiro tratamento.

Dos 232 ciclos com TE, 154 foram excluídos do estudo pelas razões descritas na Tabela 4.

<b>Tabela 4. Critérios de exclusão do presente estudo.</b>		
<b>Critérios de exclusão</b>	<b><i>n</i></b>	<b>%</b>
Idade da mulher $\geq$ a 37 anos	38	24,7
<b>Factor de infertilidade</b>		
Endometriose	10	6,5
Factor masculino isolado	54	35,1
Múltiplos factores com masculino	29	18,8
<b>Protocolo de estimulação</b>		
Agonista	5	3,2
Gonadotrofinas purificadas	3	1,9
TE ao 4º dia de desenvolvimento	3	1,9
Ciclos ICSI com espermatozóides colhidos do testículo	7	4,5
Ciclos com transferência de embriões criopreservados	5	3,2

Os resultados apresentados dizem respeito a apenas 78 ciclos, nos quais a idade média das mulheres foi de  $32,1 \pm 2,9$  anos (idades compreendidas entre os 24 e os 36 anos) e a dos homens de  $34,0 \pm 5,1$  anos (com idades a variar entre os 27 e os 60 anos). A duração média da infertilidade foi de  $4,2 \pm 2,4$  anos e o Índice de Massa Corporal (IMC) das mulheres foi de  $23,3 \pm 2,9$  kg/m<sup>2</sup>.

As diversas indicações para o tratamento da infertilidade nos casais em estudo foram o factor tubar (17,9%), ovulatório (7,8%), uterino (3,8%), múltiplos factores sem masculino (19,2%) e infertilidade de causa desconhecida (51,3%).

Foram recuperados 618 ovócitos (número médio de ovócitos colhidos por casal  $7,9 \pm 4,5$ ), dos quais 553 foram inseminados e 376 fertilizaram normalmente após FIV/ICSI (taxa de fertilização normal de 68,0%), tendo sido o seu desenvolvimento seguido diariamente até ao dia da TE. Transferiram-se 136 embriões no total ( $1,7 \pm 0,4$  embriões transferidos em média).

A taxa de gravidez clínica por TE foi de 46,2% e a taxa de implantação por TE de 29,4%.

Tal como se pode verificar pela análise da Tabela 5 não houve diferenças significativas entre o grupo das grávidas *versus* não grávidas relativamente às idades e IMC. Contudo a duração média de infertilidade nos casais com resultado positivo para teste de gravidez foi significativamente mais elevada quando comparados com casais que não atingiram gravidez ( $4,6 \pm 2,2$  *versus*  $3,8 \pm 2,6$ , respectivamente;  $P < 0,05$ ).

<b>Tabela 5.</b> Características da população em estudo e resultados globais de acordo com a obtenção ou não de gravidez.		
	<b>Grávidas (n=36)</b>	<b>Não grávidas (n=42)</b>
<b>Idade média (<math>\pm</math>DP) mulher</b>	32,2 $\pm$ 2,6	31,9 $\pm$ 3,1
<b>Idade média (<math>\pm</math>DP) homem</b>	33,3 $\pm$ 4,1	34,6 $\pm$ 5,8
<b>IMC (<math>\pm</math>DP) mulher (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23,3 $\pm$ 2,6	23,4 $\pm$ 3,2
<b>Duração média (<math>\pm</math>DP) infertilidade (anos)</b>	4,6 $\pm$ 2,2	3,8 $\pm$ 2,7 <sup>a)</sup>
<b>N.º médio (<math>\pm</math>DP) de zigotos</b>	5,1 $\pm$ 2,8	4,6 $\pm$ 3,4
<b>Nº médio (<math>\pm</math>DP) embriões transferidos</b>	1,7 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,4

a)  $P < 0,05$

O facto de um grupo de 36 transferências terem alcançado uma gravidez não se deveu ao facto de ter havido mais embriões disponíveis para escolha, uma vez que o número médio de zigotos disponíveis para cultura (5,1 $\pm$ 2,8 *versus* 4,6 $\pm$ 3,4, respectivamente) foi semelhante nos dois grupos, nem ao facto de terem sido transferidos mais embriões face ao outro grupo de 42 transferências que não resultaram em gravidez (1,7 $\pm$ 0,4 *versus* 1,7 $\pm$ 0,4, respectivamente). Estes dois resultados não apresentaram tradução estatística ( $P > 0,05$ ).

Foram realizados 59 ciclos FIV (75,6%) e 19 ciclos ICSI (24,4%). Apesar de nos ciclos ICSI se terem transferido em média um número significativamente maior de embriões quando comparado com ciclos FIV (1,7 $\pm$ 0,5 *versus* 1,9 $\pm$ 0,2, respectivamente;  $P < 0,05$ ), não houve influência da técnica de Reprodução Medicamente Assistida (RMA) nas taxas de gravidez clínica (49,2% na FIV e 36,8% na ICSI) ou na de implantação (33,3% na FIV e 18,9% na ICSI). Este facto está de acordo com o descrito na literatura (Zollner *et al.*, 2002; Racowsky *et al.*, 2003, Kattera e Chen, 2004), pelo que os resultados são apresentados sem estas diferenciações (Tabela 6).



**Tabela 6.** Características e resultados globais da população de acordo com a técnica de RMA.

	<b>FIV (n=59)</b>	<b>ICSI (n=19)</b>
<b>Idade média (<math>\pm</math>DP) mulher</b>	32,1 $\pm$ 2,8	31,8 $\pm$ 3,3
<b>Idade média (<math>\pm</math>DP) homem</b>	33,9 $\pm$ 4,5	34,8 $\pm$ 6,9
<b>Duração média (<math>\pm</math>DP) infertilidade (anos)</b>	4,1 $\pm$ 2,3	4,3 $\pm$ 2,9
<b>Taxa de fertilização normal (%)</b>	68,4	66,3
<b>N.º médio (<math>\pm</math>DP) embriões transferidos</b>	1,7 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 0,2 <sup>a)</sup>
<b>Taxa de gravidez clínica (%)</b>	49,2	36,8
<b>Taxa de implantação (%)</b>	33,3	18,9

a)  $P < 0,05$ 

Analizando os dados relativamente ao dia da transferência, verificou-se não haver diferenças nas características gerais dos casais (Tabela 7). No entanto, aqueles que transferiram ao 2º dia obtiveram, em média, um número significativamente inferior de ovócitos recuperados comparativamente aos que transferiram ao 5º dia (5,9 $\pm$ 4,3 *versus* 11,0 $\pm$ 4,4, respectivamente;  $P < 0,05$ ), bem como um número significativamente inferior de zigotos (3,8 $\pm$ 4,0 *versus* 7,0 $\pm$ 3,5, respectivamente;  $P < 0,05$ ). Por esta razão não se acrescentou dias adicionais de cultura.

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas nas características gerais da população (no que respeita às idades e duração média de infertilidade) que efectuou a transferência ao 2º, 3º ou 5º dias, assim como no número médio de embriões transferidos. Por estes motivos, na apresentação dos resultados finais não se procedeu à diferenciação por dia de transferência.

**Tabela 7.** Características e resultados globais da população em estudo consoante o dia da transferência.

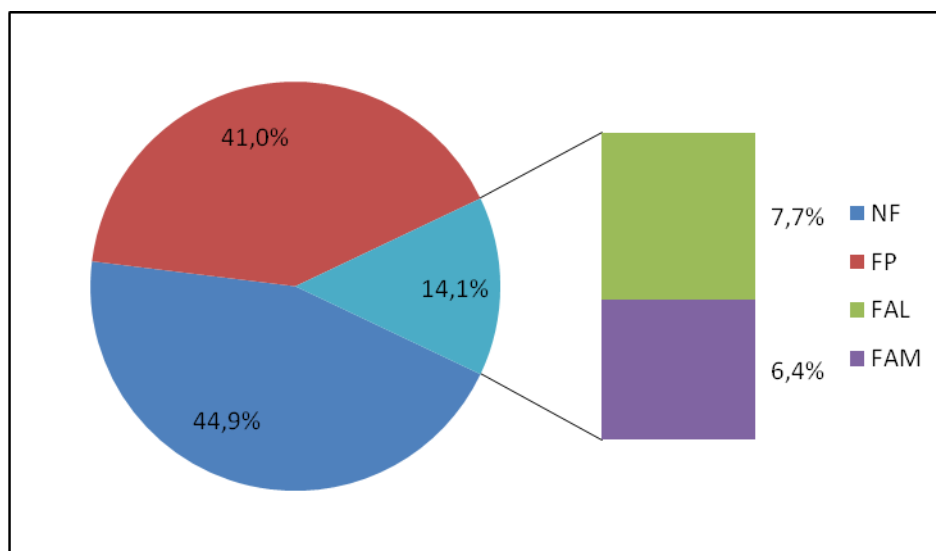
	<b>Dia 2 (n=14)</b>	<b>Dia 3 (n=57)</b>	<b>Dia 5 (n=7)</b>
<b>Idade média (±DP) mulher</b>	31,2±2,5	32,1±3,0	33,3±1,5
<b>Idade média (±DP) homem</b>	33,5±3,4	34,1±5,6	34,3±3,7
<b>Duração média (±DP) infertilidade (anos)</b>	4,6±1,9	3,9±2,3	5,1±3,9
<b>N.º médio (±DP) ovócitos recuperados</b>	5,9±4,3	8,0±4,3	11,0±4,1 <sup>a)</sup>
<b>N.º médio (±DP) de zigotos</b>	3,8±4,0	4,8±2,7	7,0±3,5 <sup>a)</sup>
<b>N.º médio (±DP) embriões transferidos</b>	1,6±0,5	1,8±0,4	1,6±0,5

a)  $P < 0,05$ 

### 3.2 HÁBITOS TABÁGICOS DAS MULHERES EM ESTUDO

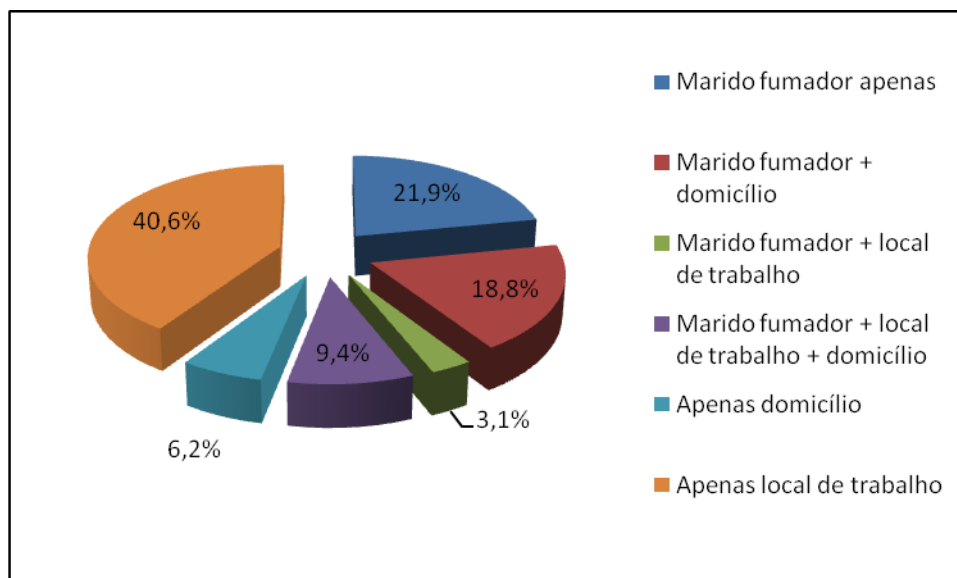
De acordo com as respostas obtidas segundo a entrevista realizada, relativamente à exposição das mulheres ao fumo do tabaco, foram constituídos três grupos. Desta forma o grupo NF englobou 35 mulheres não fumadoras e cujo cônjuge é também não fumador (44,9%), o grupo FP incluiu 32 de mulheres com exposição passiva ao fumo do tabaco (41,0%), isto é mulheres não fumadoras mas que afirmaram exposição a ambientes de fumo no domicílio ou local de trabalho, ou cujo cônjuge é fumador, e por fim o grupo FA com 11 mulheres fumadoras de pelo menos um cigarro por dia (14,1%).

As mulheres FA foram ainda classificadas em dois novos subgrupos: Subgrupo das mulheres fumadoras activas ligeiras (FAL) constituído por mulheres que fumam entre um e dez cigarros por dia (7,7% do total;  $n=6$ ); e Subgrupo das mulheres fumadoras activas moderadas (FAM) constituído por mulheres que fumam 10 cigarros por dia ou mais (6,4%;  $n=5$ ) (Figura 14).



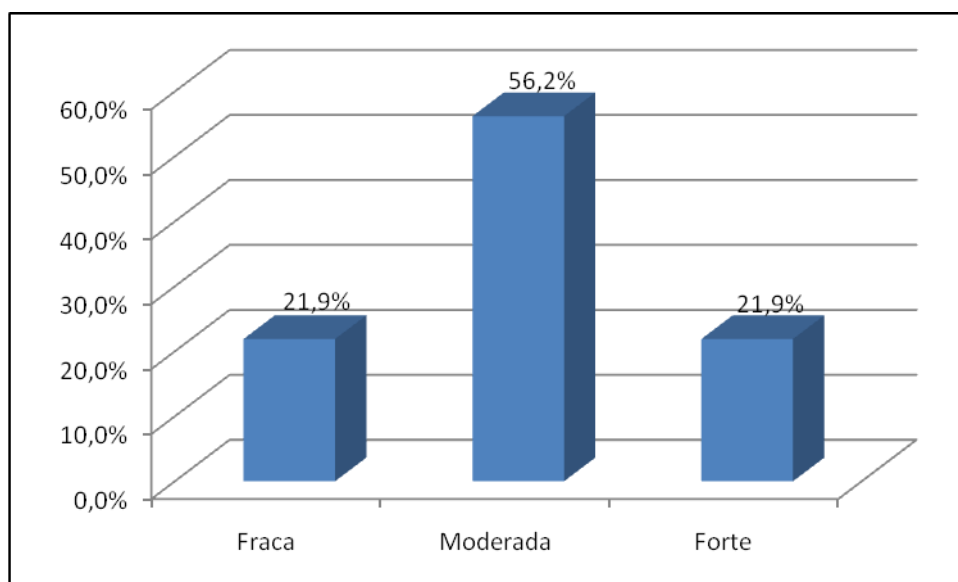
**Figura 14.** Distribuição das mulheres por grupos, tendo em conta os seus hábitos tabágicos (%).

No grupo das FP, e relativamente à origem da exposição ao Fumo Ambiental do Tabaco (FAT), em 7 das 32 mulheres (21,9%) o cônjuge era fumador, não estando expostas a mais nenhuma fonte de fumo do tabaco; 6 das 32 (18,8%) o cônjuge era fumador e estavam expostas ao FAT no domicílio; 1 das 32 (3,1%) o cônjuge era fumador e a fonte de exposição ao FAT era proveniente também do local de trabalho; 3 das 32 mulheres (9,4%) a origem de exposição advinha do facto do cônjuge ser fumador e de estarem expostas ao FAT quer no domicílio quer no local de trabalho; 2 (6,2%) estavam expostas apenas do domicílio e por fim em 13 mulheres (40,6%) a fonte de exposição ao fumo do tabaco dava-se apenas no local de trabalho (Figura 15).



**Figura 15.** Origem da exposição das mulheres ao FAT no grupo FP (%).

Neste mesmo grupo e de acordo com a intensidade de exposição, 7 mulheres apresentaram exposição fraca (21,9%); 18 exposição moderada (56,2%) e 7 apresentavam exposição forte (21,9%) (Figura 16).



**Figura 16.** Intensidade da exposição das mulheres ao FAT no grupo FP (%).

### 3.2.1 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO EM ESTUDO TENDO EM CONTA OS HÁBITOS TABÁGICOS DAS MULHERES

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NF, FP, FA, em relação à duração média de infertilidade ( $4,2 \pm 2,4$  *versus*  $4,0 \pm 2,2$  *versus*  $4,5 \pm 2,2$ , respectivamente), dose média ( $\pm$ DP) total de estimulação ( $1434,6 \pm 476,1$  *versus*  $1591,1 \pm 574,2$  *versus*  $1693,1 \pm 791,6$ , respectivamente), número médio ( $\pm$ DP) de dias de estimulação ( $10,1 \pm 1,6$  *versus*  $10,8 \pm 1,9$  *versus*  $10,5 \pm 2,0$ , respectivamente) e número médio ( $\pm$ DP) de folículos com dimensões superiores as 16 mm no dia da hCG ( $5,9 \pm 3,1$  *versus*  $4,6 \pm 2,0$  *versus*  $6,3 \pm 3,3$ , respectivamente) (Tabela 8).

<b>Tabela 8.</b> Características dos grupos de estudo.			
	<b>Hábitos tabágicos</b>		
	<b>NF (n=35)</b>	<b>FP (n=32)</b>	<b>FA (n=11)</b>
<b>Idade média (<math>\pm</math>DP) das mulheres</b>	31,2 $\pm$ 3,0	31,5 $\pm$ 2,9	33,0 $\pm$ 2,2
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>) das mulheres</b>	23,1 $\pm$ 3,2	23,7 $\pm$ 2,7	23,2 $\pm$ 2,7
<b>Duração média (<math>\pm</math>DP) de infertilidade</b>	4,2 $\pm$ 2,7	4,0 $\pm$ 2,2	4,5 $\pm$ 2,2
<b>Dose média (<math>\pm</math>DP) total de estimulação</b>	1434,6 $\pm$ 476,1	1591,1 $\pm$ 574,2	1693,1 $\pm$ 791,6
<b>N.º médio (<math>\pm</math>DP) de dias de estimulação</b>	10,1 $\pm$ 1,6	10,8 $\pm$ 1,9	10,5 $\pm$ 2,0
<b>N.º médio (<math>\pm</math>DP) de folículos &gt;16 mm no dia hCG</b>	5,9 $\pm$ 3,1	4,6 $\pm$ 2,0	6,3 $\pm$ 3,3

### 3.2.2 NÍVEIS DE COTININA NO LÍQUIDO FOLICULAR

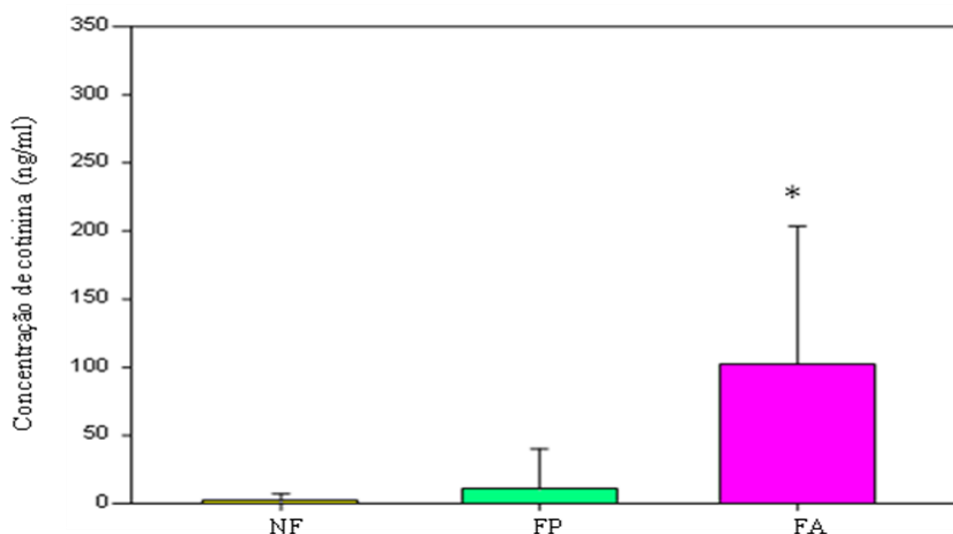
Com o objectivo de quantificar o nível de exposição ao FAT, determinou-se a concentração de cotinina no líquido folicular das mulheres inseridas no programa de Fertilização *in vitro*.

Os valores encontrados para a cotinina no total da população em estudo variaram entre 0,4 ng/ml e 287,4 ng/ml, com valor médio de  $19,7 \pm 53,3$  ng/ml.

O grupo NF apresentou uma concentração de cotinina a variar entre 0,4 e 31,3 ng/ml, com uma média de  $2,0 \pm 5,1$  ng/ml.

Os valores de concentração de cotinina nas FP variaram entre 0,5 e 140,4 ng/ml com um valor médio de  $10,7 \pm 29,4$  ng/ml. Apesar de se ter verificado uma tendência para um aumento de concentração de cotinina nas FP relativamente à concentração encontrada nas NF, este resultado não teve significado estatístico ( $P > 0,05$ ).

O grupo FA apresentou valores de concentração de cotinina entre 1,5 e 287,4 ng/ml com um valor médio de  $102,1 \pm 101,2$  ng/ml. Consequentemente, as FA mostraram em média conter uma concentração de cotinina no líquido folicular significativamente superior ao grupo NF ( $102,1 \pm 101,2$  versus  $2,0 \pm 5,1$ ;  $P < 0,001$ ), bem como quando comparada com o grupo FP ( $102,1 \pm 101,2$  versus  $10,7 \pm 29,4$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 17).

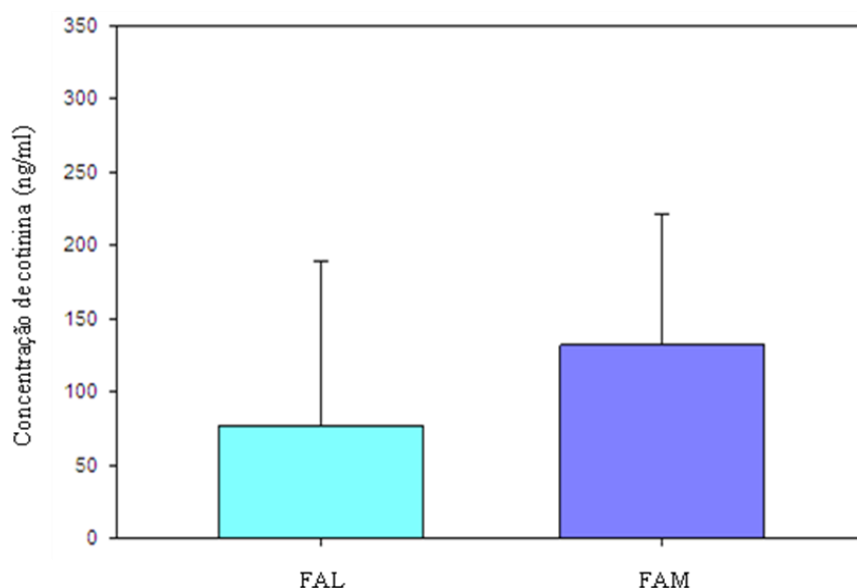


**Figura 17.** Níveis de cotinina (ng/ml) nos grupos de estudo (\*  $P < 0,001$ ).

Ao subdividir o grupo FP, quanto à origem e intensidade do fumo ambiental, não foram encontradas diferenças com significado estatístico relativamente às concentrações de cotinina encontradas (Tabela 9).

<b>Tabela 9.</b> Níveis de cotinina no grupo FP, tendo em conta a origem e intensidade do FAT.		
		<b>Concentração de cotinina no líquido folicular (ng/ml)</b>
	<b><i>n</i></b>	<b>Med±DP</b>
<b>Origem</b>		
Cônjuge fumador, apenas	<b>7</b>	0,7±0,4
Cônjuge fumador + domicílio	<b>6</b>	6,1±10,6
Cônjuge fumador + local de trabalho	<b>1</b>	1,82±?
Cônjuge fumador + domicílio + local de trabalho	<b>3</b>	19,6±31,9
Apenas domicílio	<b>2</b>	1,8±0,3
Apenas local de trabalho	<b>13</b>	18,1±42,9
<b>Intensidade</b>		
Fraca	<b>7</b>	20,9±52,3
Moderada	<b>18</b>	7,2±19,7
Forte	<b>7</b>	9,3±20,9

Na população total das FA, o número de cigarros consumidos por dia em média foi de 8. Os níveis de cotinina acumulada foram proporcionais ao número de cigarros consumidos, contudo este aumento progressivo da concentração de cotinina no líquido folicular entre o subgrupo FAL e FAM não resultou em diferenças consideradas estatisticamente significativas (77,4±111,9 *versus* 131,9±89,1, respectivamente;  $P>0,05$ ) (Figura 18).



**Figura 18.** Níveis de cotinina (ng/ml) nos grupos FAL e FAM.

Ainda no grupo FA, 7 mulheres fumaram no dia anterior à punção e em todas elas foram detectados níveis de cotinina no líquido folicular com uma média de  $159,4 \pm 81,0$  ng/ml, 2 mulheres fumaram dois dias antes da punção folicular ( $2,5 \pm 0,9$  ng/ml) e as restantes, 3 semanas ( $1,5 \pm ?$  ng/ml) e 1 mês antes ( $1,5 \pm ?$  ng/ml), como ilustra a Tabela 10. É possível verificar um aumento de concentração de cotinina nas mulheres que fumaram o seu último cigarro no dia anterior à punção quando comparadas com as que fumaram 2 dias antes. Este aumento, traduziu-se em diferenças estatisticamente significativas ( $159,4 \pm 81,0$  versus  $2,5 \pm 0,9$ , respectivamente;  $P < 0,05$ ) relativamente ao último cigarro fumado e os níveis de cotinina determinados no líquido folicular.

**Tabela 10.** Concentração de cotinina no líquido folicular tendo em conta o último cigarro fumado em relação ao dia da punção folicular.

		Concentração de cotinina no líquido folicular (ng/ml)		
	<i>n</i>	Mínimo	Máximo	Med $\pm$ DP
<b>1 Dia</b>	7	58,9	287,4	$159,4 \pm 81,0^a$
<b>2 Dias</b>	2	1,8	3,1	$2,5 \pm 0,9$
<b>3 Semanas</b>	1	1,5	1,5	$1,5 \pm ?$
<b>1 Mês</b>	1	1,5	1,5	$1,5 \pm ?$

$P < 0,05$



### 3.3 EXPOSIÇÃO DAS MULHERES AO FUMO DO TABACO E OS DIFERENTES PARÂMETROS LABORATORIAIS DO PROGRAMA DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

Os hábitos tabágicos das mulheres NF, FP e FA não interferiram sobre o número médio ( $\pm$ DP) de ovócitos recuperados por casal ( $7,5\pm4,0$  *versus*  $8,3\pm4,9$  *versus*  $8,1\pm4,3$ , respectivamente;  $P>0,05$ ) assim como também não afectou o número médio de ovócitos inseminados ( $6,5\pm4,0$  *versus*  $7,5\pm4,7$  *versus*  $7,6\pm4,4$ , respectivamente;  $P>0,05$ ) e o número médio de zigotos obtidos ( $4,6\pm2,7$  *versus*  $5,2\pm3,7$  *versus*  $4,5\pm2,3$ , respectivamente;  $P>0,05$ ) (Tabela 11).

Verificou-se que no grupo da FA há uma tendência para uma menor taxa de fertilização quando comparado com o grupo das NF e FP. Contudo, este resultado não apresentou tradução estatística ( $P>0,05$ ).

A qualidade embrionária não foi influenciada pelos hábitos tabágicos das mulheres. Pela análise da proporção de embriões de boa qualidade, verificou-se não haver diferenças estatisticamente significativas entre a qualidade dos embriões obtidos no grupo das mulheres NF, quando comparadas com as FP e FA ( $P>0,05$ ).

Por fim, o número médio ( $\pm$ DP) de embriões transferidos por casal não se traduziu em diferenças estatísticas entre os três grupos de estudo.

<b>Tabela 11.</b> Análise dos parâmetros laboratoriais nos diferentes grupos de estudo.			
	<b>Hábitos tabágicos</b>		
	<b>NF</b> <b>(n=35)</b>	<b>FP</b> <b>(n=32)</b>	<b>FA</b> <b>(n=11)</b>
<b>N.º ovócitos recuperados (n)</b>	262	267	89
<b>N.º médio (<math>\pm</math>DP) de ovócitos recuperados</b>	$7,5\pm4,0$	$8,3\pm4,9$	$8,1\pm4,3$
<b>N.º médio (<math>\pm</math>DP) ovócitos inseminados</b>	$6,5\pm4,0$	$7,5\pm4,7$	$7,6\pm4,4$
<b>N.º médio (<math>\pm</math>DP) de zigotos</b>	$4,6\pm2,7$	$5,2\pm3,7$	$4,5\pm2,3$
<b>Taxa de fertilização (%)</b>	70,3	69,2	58,3
<b>% de embriões de boa qualidade</b>	82,5	85,2	75,0
<b>N.º embriões transferidos (n)</b>	63	53	20
<b>N.º médio (<math>\pm</math>DP) de embriões transferidos</b>	$1,8\pm0,4$	$1,7\pm0,5$	$1,8\pm0,4$

### 3.4 EXPOSIÇÃO DAS MULHERES AO FUMO DO TABACO E OS DIFERENTES PARÂMETROS CLÍNICOS DO PROGRAMA DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

Pelos resultados descritos na Tabela 12, as mulheres FA mostram uma tendência para uma menor taxa de gravidez clínica quando comparada com o grupo de mulheres FP e NF (27,3% *versus* 46,9% *versus* 51,4%, respectivamente). Uma tendência para uma menor taxa implantação foi também observada o grupo FA (20,0% *versus* 32,0% *versus* 30,1%, respectivamente). Contudo, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas nestes dois resultados ( $P>0,05$ ), embora seja de notar uma relação dose-efeito entre os hábitos tabágicos e as taxa de sucesso alcançadas.

<b>Tabela 12</b> Análise dos parâmetros clínicos nos diferentes grupos de estudo.			
	<b>Hábitos tabágicos</b>		
	<b>NF</b> <b>(n=35)</b>	<b>FP</b> <b>(n=32)</b>	<b>FA</b> <b>(n=11)</b>
<b>N.º de grávidas (n)</b>	18	15	3
<b>Taxa de gravidez clínica (%)</b>	51,4	46,9	27,3
<b>Taxa de implantação (%)</b>	30,1	32,0	20,0

Nas últimas duas décadas, a preocupação com o meio ambiente e a sua influência sobre a saúde tem crescido e ocupado as agendas políticas e sociais, nacionais e internacionais. Na conferência da Terra, a ECO 92, realizada no Rio de Janeiro, em 1992, discutiu-se sobre a necessidade de preservar a natureza, a fim de garantir o equilíbrio do ecossistema no qual o Homem está inserido, por meio de um desenvolvimento sustentável dos recursos naturais. Neste contexto, as questões ambientais começaram a ser consideradas como um problema de saúde pública e a sua preocupação disseminada por todas as áreas de actuação da medicina.

Relativamente à Reprodução Humana, é de considerar vários factores que apontam para os impactos que os aspectos biológicos, físicos e sociais têm vindo a desempenhar na redução da fertilidade. Os hábitos de vida são um exemplo disso mesmo, representando decisões tomadas pelos indivíduos com repercussões na sua própria saúde, como por exemplo, o consumo de drogas, álcool e tabaco, os erros nos padrões alimentares, *stress*, exposição a tóxicos e radiações. Estes e outros factores contribuem para a incidência da infertilidade na população e a procura cada vez maior dos tratamentos de Reprodução Medicamente Assistida (RMA). Neste estudo deu-se particular importância à questão do tabagismo na saúde reprodutiva feminina, pelo que foi nosso intuito estudar o impacto das acções nocivas do tabaco, quer inalado de forma activa, quer de forma passiva, no sucesso das técnicas de RMA.

A saúde reprodutiva feminina é desde há muitos anos, tema de interesse e discussão, quer nos meios académicos, quer na comunicação social. A complexidade biológica, social e comportamental da mulher, acrescida dos vários papéis que desempenha no seio de uma sociedade, tornaram-na um indivíduo em constante mudança.

Quando se procura compreender a questão do tabagismo, há dois aspectos a considerar. Por um lado, a iniciação tabágica ocorre maioritariamente na puberdade e a dependência instala-se durante a adolescência. Por outro lado, a prevalência das mulheres que fumam tem aumentado ao longo das últimas décadas, aumentando também a importância deste comportamento na fertilidade feminina. Não obstante, este hábito integrou-se no seu dia-a-dia, associado a uma falsa imagem de independência. A par de todos estes factos, a exposição ao fumo do tabaco, em locais públicos local de trabalho ou em casa, tornou-se um factor de risco (USDHHS, 2006).

Em Portugal, os Inquéritos Nacionais de Saúde confirmam a diminuição da prevalência tabágica masculina e o seu aumento no sexo feminino (Ministério da Saúde, 2000).

Infelizmente, as acções nocivas das substâncias tóxicas do cigarro na concepção e na gravidez são difíceis de determinar, o que dificulta a consciencialização das mulheres para os impactos causados na sua fertilidade (Hull *et al.*, 2000). Relativamente às perturbações menstruais, há evidências sugestivas de que fumar possa estar associado a dismenorrea e a irregularidades menstruais (Chen *et al.*, 2000; Kapoor e Jones, 2005), bem como a uma menopausa precoce em cerca de um a quatro anos (Nemr *et al.*, 1998; The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2005; Lambert-Messerlian e Harlow, 2006).

Estando comprovada a influência da qualidade dos gâmetas nas variáveis reprodutivas, no presente estudo, optou-se por efectuar uma selecção dos casais estabelecendo critérios de inclusão, designadamente idade materna inferior a 37 anos, ciclos em que a terapêutica para a indução da ovulação se realizou através de um protocolo curto com antagonistas da GnRH seguida de estimulação ovárica com FSH recombinante, uso de espermatozóides colhidos a fresco do ejaculado do cônjuge ou parceiro, e em que o factor de infertilidade não estava atribuído a endometriose nem a factor masculino. Desta forma, foram efectuadas a fresco todas as 78 transferências incluídas.

Diversos autores avaliaram os efeitos da exposição das mulheres ao tabagismo utilizando os questionários como ferramenta de estudo para quantificar a exposição ao Fumo Ambiental do Tabaco (FAT) (Harrison *et al.*, 1990; Klonoff-Cohen *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2006). Contudo, a imprecisão destes instrumentos como meios para quantificar essa exposição fez com que um número crescente de estudos incorporasse um biomarcador, principalmente a cotinina, como uma medida objectiva da avaliação do fumo ambiental (Motejlek *et al.*, 2006; Fuentes *et al.*, 2008).

Segundo Jaakkola e Jaakkola (1997), a vantagem dos questionários na avaliação da exposição ao FAT está nos seguintes aspectos: i) Fornecem uma informação detalhada da intensidade de exposição ao fumo ambiental; ii) Propiciam informações retrospectivas quando não é possível efectuar medições da concentração de biomarcadores ou dos

poluentes no meio ambiente; iii) Permitem obter informações sobre a exposição a longo prazo, a qual é relevante para muitos efeitos do fumo na saúde; iv) São os métodos de menor custo para se obter informação sobre a exposição ao fumo, para além de serem adequados para estudos de grandes amostras. Por outro lado, apresentam aspectos negativos, tais como: i) Falta de padronização para que os questionários sejam aceites universalmente; ii) Possibilidade de erro devido à incapacidade dos entrevistados se recordarem da exposição ao fumo; iii) Resposta falsa intencional sobre a exposição ao fumo.

No presente trabalho, optou-se por realizar uma entrevista e o doseamento bioquímico de um biomarcador no líquido folicular, a cotinina, possibilitando uma avaliação mais fidedigna da exposição das mulheres ao FAT. A facilidade de recolha, o baixo custo e o facto de o líquido folicular conter uma mistura de hormonas esteróides e diversos péptidos que reflectem o microambiente onde o ovócito cresce e se desenvolve (Angelucci *et al.*, 2006), justificaram ainda a escolha deste fluído como material de estudo.

Na determinação da concentração de cotinina, utilizou-se um Kit comercial já testado por outros autores (Montejlek *et al.*, 2006), pelo método bioquímico ELISA. Métodos como radioimunoensaio e cromatografia gasosa poderiam também ter sido utilizados neste tipo de estudo pela sua especificidade e sensibilidade (Dhar, 2004).

Na metodologia utilizada, o líquido folicular foi recolhido do folículo de maior diâmetro com dimensões iguais ou superiores a 17 mm mas apenas de um ovário. A realização de pelo menos outra recolha de líquido proveniente do outro ovário (se assim existisse pelo menos um folículo com a dimensão pretendida), asseguraria uma avaliação mais precisa do grau de exposição das mulheres ao fumo ambiental, como foi proposto por Zenzen e Reed (1998). Estes autores acompanharam 71 casais distribuídos por três grupos de acordo com os hábitos tabágicos das mulheres [Grupo das não fumadoras ( $n=37$ ), fumadoras passivas ( $n=8$ ), mulheres fumadoras ( $n=16$ )]. Após realizarem os doseamentos de cotinina no líquido folicular provenientes de cada ovário da mesma mulher, concluíram que um quarto das mulheres expostas ao fumo ambiental do tabaco apresentou diferenças significativas nos níveis de cotinina. Embora os argumentos dos autores sejam aceitáveis, é interessante observar que, apesar da aspiração de um único folículo ser um factor limitante, são raros os estudos em que a avaliação da cotinina presente no líquido folicular se tenha

baseado em mais que uma recolha. Além disso, no presente estudo, efectuou-se o doseamento bioquímico em duplicado de cada amostra de líquido folicular, no sentido de reduzir algumas das limitações.

Obteve-se, para o presente trabalho, uma concordância muito significativa entre as informações sobre os hábitos tabágicos das mulheres relatadas e os níveis de cotinina no líquido folicular ( $P < 0,001$ ). O grupo FA apresentou o valor mais elevado de cotinina no líquido folicular, seguido do grupo FP e por fim o grupo NF. Este resultado demonstra que os dados fornecidos pelos casais foram fidedignos quando comparados com os resultados da concentração de cotinina.

A literatura refere que concentrações de cotinina inferiores a 10 ng/ml classificam grupos de não fumadores e/ou fumadores passivos, ao passo que valores superiores a 10 ng/ml estão associados a fumadores activos (Gane *et al.*, 2005). Neste estudo e tal como referido, o grupo FA apresentou um aumento médio significativo de concentração de cotinina no líquido folicular que o grupo das NF.

Outros autores também reportaram um aumento significativo de cotinina em outros órgãos e tecidos em fumadores e fumadores passivos, quando comparado com não fumadores: soro (Vine *et al.*, 1993; Caraballo *et al.*, 2001; Vartiainen *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2008, urina (Vine *et al.*, 1993; Thaqi *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008), saliva (Etter *et al.*, 2000), sémen (Vine *et al.*, 1993; Pacifici *et al.*, 1995), líquido amniótico (Jordanov, 1990), muco cervical (McCann *et al.*, 1992), cabelo (Eliopoulos *et al.*, 1994).

Sabe-se que a concentração de cotinina aumenta com o número de cigarros consumidos por dia (Zenzes *et al.*, 1996, Practice Committee of the American Society for reproductive Medicine, 2004; Fuentes *et al.*, 2008). Embora, no presente estudo, se tenha verificado uma tendência para um aumento de concentração de cotinina em mulheres fumadoras activas moderadas (em que o número de cigarros consumidos por dia varia entre 10 a 20) quando comparadas com mulheres fumadoras activas ligeiras (menos de 10 cigarros por dia), este aumento não teve tradução estatística.

Deve tecer-se um comentário acerca da variação inter-individual dos níveis de cotinina existentes nos grupos das FA e nos que relataram consumir o mesmo número de

cigarros por dia, conforme observada por Swan e colaboradores (1993), facto que poderá justificar os resultados obtidos.

Quando determinados os níveis de cotinina em mulheres que fumaram o seu último cigarro no dia anterior à punção, obtiveram-se diferenças estatisticamente significativas ( $P<0,05$ ), quando comparadas com as que fumaram 48 horas antes. Este facto vai de encontro à literatura consultada, uma vez que a meia vida da cotinina é cerca de 20 a 24 horas. Por outro lado, sendo um metabolito muito estável, pode tornar-se útil para distinguir fumadores, fumadores passivos e não fumadores, quando comparado com a nicotina que tem uma meia vida de cerca de 2 horas (Zenzes, 2000; Meeker *et al.*, 2007).

Apesar de não se terem verificado alterações significativas ao nível da intensidade de exposição das mulheres ao FAT (grupo FP) e os níveis de cotinina, esta relação dose-resposta tem sido comprovada por outros autores. Winkelstein e colaboradores (1997), afirmaram que crianças que habitam com um fumador apresentam em média, cinco vezes mais cotinina na urina, comparativamente às que vivem com indivíduos não fumadores. Estes autores descreveram ainda que as crianças que vivem com mais que um fumador têm níveis quatro vezes maiores de cotinina na urina, comparativamente com crianças que vivem com um só fumador.

Na segunda fase do trabalho, quando se pretendeu avaliar a influência dos hábitos tabágicos nos vários parâmetros laboratoriais e clínicos do programa de RMA, vários aspectos foram tidos em consideração para que os grupos de estudo se apresentassem homogéneos relativamente a algumas variáveis que pudessem predizer o sucesso dos tratamentos e desta forma serem consideradas variáveis de enviesamento.

Os três grupos de estudo (NF, FP, FA) mostraram-se similares no que respeitou à idade média das mulheres ( $31,2\pm3,0$  *versus*  $31,5\pm2,9$  *versus*  $33,0\pm2,2$ , respectivamente), índice de massa corporal (IMC) ( $23,1\pm3,2$  *versus*  $23,7\pm2,7$  *versus*  $23,2\pm2,7$ , respectivamente), duração média de infertilidade ( $4,2\pm2,7$  *versus*  $4,0\pm2,2$  *versus*  $4,5\pm2,2$ , respectivamente), dose média total de estimulação ( $1434,6\pm476,1$  *versus*  $1591,1\pm574,2$  *versus*  $1693,1\pm791,6$ , respectivamente), número médio de dias de estimulação ( $10,1\pm1,6$  *versus*  $10,8\pm1,9$  *versus*  $10,5\pm2,0$ , respectivamente) assim como número médio de folículos com dimensão superior a 16 mm no dia de hCG ( $5,9\pm3,1$  *versus*  $4,6\pm2,0$  *versus*  $6,3\pm3,3$ , respectivamente), não se traduzindo em diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ).

A distribuição dos factores de infertilidade assim como das técnicas de RMA aplicadas não influenciou os resultados posteriormente obtidos, uma vez que as diferenças não tiveram tradução estatística ( $P>0,05$ ). Contudo, uma questão que se pode levantar é a possibilidade dos resultados apresentados, poderem ser diferentes consoante a técnica de inseminação, apesar das características gerais das duas populações terem sido semelhantes. Montag e Van der Ven (2001) mostraram uma diferença na morfologia quando comparavam embriões provenientes de ICSI e FIV, o que mais provavelmente se correlaciona com a diferença no tempo de inseminação nos dois grupos de trabalho. De facto, na ICSI o momento exacto em que o ovócito é inseminado é conhecido, não acontecendo o mesmo na FIV. Por outro lado, o tempo proporcionado à ocorrência de fertilização varia (1 a 4 horas, 16 a 18 horas).

Uma associação significativa entre os hábitos tabágicos e a questão da infertilidade tem sido proposta por vários autores, clínicos e organizações. Contudo, não existe ainda consenso na magnitude ou no mecanismo que desencadeia esse efeito (Crha *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2006).

Já tem sido sugerido que mulheres fumadoras activas apresentam uma menor probabilidade de sucesso nas técnicas de RMA quando comparadas com as restantes. Uma explicação para este facto poderá estar relacionada com a diminuição da reserva ovária avaliada pelo número de ovócitos maduros obtidos por punção folicular (Sharara *et al.*, 1994; Freour *et al.*, 2007). O mecanismo inerente a esta diminuição da reserva ovária, segundo Paszkowski e colaboradores (2002), relaciona-se com um desequilíbrio no processo oxidativo/anti-oxidativo no interior dos folículos, comprometendo a foliculogénese nas fumadoras, conduzindo a um *stress* oxidativo nos folículos. A diminuição da capacidade anti-oxidativa do líquido folicular nas fumadoras é provavelmente um fenómeno secundário causado pelo consumo de anti-oxidantes, em resposta às espécies reactivas de oxigénio, originadas ou induzidas pelo fumo do tabaco.

A qualidade ovocitária e o seu grau de maturação não foram parâmetros avaliados neste trabalho, uma vez que requerem a remoção das células do *cumulus oophorus*, situação que ocorre nos casos de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) e a avaliação do embrião após ICSI pode anular qualquer parâmetro negativo do ovócito (Scott *et al.*, 2007). Contudo, Zenzes e colaboradores (1997) comprovaram a correlação entre o



fumo do tabaco e a diminuição do número de ovócitos maduros recuperados após indução da ovulação em ciclo de RMA.

Uma outra hipótese descrita para explicar os possíveis efeitos negativos dos compostos do fumo do tabaco na maturação ovocitária relaciona-se com a diminuição da vascularização dos ovários.

Motejlek e colaboradores (2006), ao compararem líquidos foliculares verificaram que os níveis foliculares do receptor *c-fms-like tyrosine Kinase* (Flt-1) do factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) eram significativamente mais elevados em mulheres fumadoras quando comparadas com as não fumadoras. Estes autores defenderam ainda que este fenómeno poderia resultar na alteração do mecanismo da angiogénese, pela diminuição da vascularização dos ovários, observando-se como consequência a diminuição do número de ovócitos maduros recuperados.

No presente estudo, relativamente ao número médio de ovócitos recuperados (independentemente do seu grau de maturação), não houve diferença estatisticamente significativa nos grupos NF, FP e FA ( $7,5 \pm 4,0$  versus  $8,3 \pm 4,9$  versus  $8,1 \pm 4,3$ , respectivamente). Estes resultados diferem de alguns descritos na literatura. Assim, alguns autores observaram uma redução do número de ovócitos recuperados em mulheres fumadora activas, quando comparadas com não fumadoras (Van Voorhis *et al.*, 1992; El-Nemr, 1998).

Uma possível limitação do presente estudo na avaliação da resposta ovárica das mulheres fumadoras consistiu em não ter sido considerado a exposição das mulheres ao foco de fumo, o tamanho e ventilação dos espaços onde está exposta, bem como a taxa de cancelamento de ciclos por má resposta ovárica.

A análise da taxa de fertilização entre os três grupos (NF, FP; FA) revelou resultados semelhantes, não se traduzindo em diferenças significativas ( $70,3\%$  versus  $69,2\%$  versus  $58,3\%$ , respectivamente).

Na literatura consultada existe uma discrepância notável nos resultados descritos no que respeita a este parâmetro. Este facto pode ser devido às diferenças nos critérios utilizados, tais como, idade, uso de diferentes protocolos de estimulação ovárica, bem

como à heterogeneidade na definição dos hábitos tabágicos e, conseqüentemente, na constituição dos grupos.

Vários autores descreveram uma diminuição significativa da taxa de fertilização em mulheres fumadoras quando comparada com as não fumadoras (Elenbogen *et al.*, 1991; Rosevear *et al.*, 1992; Crha *et al.*, 2001; Tiboni *et al.*, 2004), um estudo reportou uma taxa significativamente superior em fumadoras (Crha *et al.*, 2003), enquanto outros apresentaram resultados semelhantes (Trapp *et al.*, 1986; Pattinson *et al.*, 1991; Hughes *et al.*, 1994; Sharara *et al.*, 1994; Sterzik *et al.*, 1996; Van Voorhis *et al.*, 1996; El-Nemr *et al.*, 1998; Joesbury *et al.*, 1998; Weigert *et al.*, 1999; Neal *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2006). Saliente-se o facto de apenas os estudos de Sterzik e colaboradores (1996) e Neal e colaboradores (2005) fazerem a distinção entre fumadoras activas, passivas e não fumadoras, sendo o primeiro realizado de acordo com níveis de cotinina presentes no líquido folicular e o segundo de acordo com informações obtidas segundo questionário.

Sterzik e colaboradores (1996) defendem que a possível diminuição da qualidade ovocitária devido ao fumo do tabaco poderá ser compensada por espermatozóides de morfologia normal e funcional e daí não se observarem diferenças estatisticamente significativas na taxa de fertilização entre grupos de fumadoras e não fumadoras. Este hipotético mecanismo de compensação, que não se verifica quando os parâmetros espermáticos se encontram alterados, poderá ser avaliado em casais cujo factor de infertilidade não está identificado como sendo de causa masculina, avaliando-se a taxa de fertilização de acordo com os hábitos tabágicos das mulheres.

É de notar que os espermatozóides seleccionados para cada caso poderem não ter a mesma qualidade. Contudo, todos foram sujeitos ao mesmo processamento de selecção. Neste trabalho, não se teve em consideração os hábitos tabágicos do cônjuge e a sua influência no sucesso dos tratamentos de RMA. Apenas se recolheu informações sobre o tabagismo masculino para determinar uma possível fonte de exposição das mulheres ao FAT (sendo estas, posteriormente incluídas no grupos das mulheres fumadoras passivas).

Salienta-se, assim o facto dos estudos que relatam a taxa de fertilização entre grupos com diferentes hábitos tabágicos se apresentem muitas vezes controversos.

Estudos sobre a qualidade embrionária em mulheres fumadoras são escassos, sendo que a maior parte deles são centrados nas respostas ováricas e nas taxas de fertilização. Apesar de no presente estudo não terem sido observadas alterações significativas do efeito do tabagismo sobre a qualidade embrionária, Joesbury e colaboradores (1998) comprovaram a existência de uma melhor classificação na avaliação da qualidade embrionária nas mulheres não fumadoras quando comparadas com as fumadoras ( $P < 0,05$ ). Weigert e colaboradores (1999) verificaram, igualmente, um impacto negativo sobre a qualidade embrionária nas mulheres fumadoras, atribuído ao aumento significativo dos níveis de LH nestas, além do menor número de ovócitos recuperados ( $P = 0,002$ ).

Aquando da realização das técnicas de RMA, os critérios vulgarmente utilizados para avaliar a qualidade dos ovócitos a fertilizar e os embriões a implantar baseiam-se no seu aspecto morfológico, em especial a velocidade de segmentação das células. Este tipo de análise, adoptado neste trabalho é para certos autores análise subjectiva não garantindo, de um modo fiável, a qualidade do embrião. Estudos genéticos realizados em embriões que não foram transferidos nem criopreservados revelaram a relação entre determinadas características morfológicas e anomalias cromossómicas (Munné *et al.*, 2003; Verlinsky *et al.*, 2004; Sher *et al.*, 2005). Relativamente a este parâmetro, houve um enviesamento na selecção dos embriões a transferir, uma vez que a maior parte dos casos não foram seleccionados embriões que, na fase de quatro e oito células, apresentassem grau C e D, facto que poderá justificar os resultados aqui apresentados.

De forma a avaliar o efeito do fumo do tabaco no sucesso dos tratamentos RMA, torna-se imprescindível o estudo da taxa de gravidez clínica, por transferência embrionária, o que permite uma avaliação objectiva da eficácia do próprio ciclo.

O efeito exacto dos compostos do fumo do tabaco sobre a taxa de gravidez clínica torna-se difícil de explicar para Freour e colaboradores (2007), embora comprovem diferenças estatisticamente significativas entre o grupo fumadoras e não fumadoras (10,0% versus 29,6%, respectivamente;  $P = 0,02$ ). Estes autores defendem que este parâmetro deve ser estudado com base na velocidade de segmentação das células e qualidade dos embriões transferidos. Resultado semelhante foi descrito por Shiloh e colaboradores (2004), defendendo que a diminuição da taxa de gravidez clínica nas fumadoras activas e passivas pode ser justificada com o aumento de espessura da zona pelúcida nos ovócitos (avaliada

aquando a ICSI) e embriões (avaliada 48 horas após fecundação, quer antes da transferência embrionária, quer antes da criopreservação).

Neal e colaboradores (2005) relataram diferenças com significado estatístico ( $P < 0,05$ ) deste parâmetro em três grupos de estudo: FA (19,4%), FP (20,0%) e NF (48,3%).

Por outro lado, Motejlek e colaboradores (2006), não observaram diferenças significativas entre mulheres fumadoras activas e não fumadoras (32,4% *versus* 30,0%, respectivamente,  $P > 0,05$ ) bem como El-Nemr e colaboradores (1998), em que a taxa foi de 16,9% para o primeiro grupo e 21,3% para o segundo, o que vai ao encontro aos resultados obtidos no presente estudo onde não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de estudo no que respeita à taxa de gravidez clínica ( $P > 0,05$ ).

Analizando a influência do fumo do tabaco na taxa de implantação, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos de estudo. Deve tecer-se um comentário sobre este facto, uma vez que as técnicas de RMA permitem a selecção de embriões de elevada qualidade, o que poderá justificar o porquê das taxas de implantação se terem mostrado semelhantes. Contudo, existem estudos que comprovam a diminuição significativa da taxa de implantação com os hábitos tabágicos (Neal *et al.*, 2005; Freour *et al.*, 2008).

Neal e colaboradores (2005) defendem que as fases de implantação e embriogénese são as mais vulneráveis aos compostos do tabaco. Para estes autores, este facto poderá ocorrer devido a alterações da função ovárica. No estudo referido, a taxa de implantação mostrou-se com tradução estatística quando analisados os três grupos (12,0% para as fumadoras activas; 12,6% para as fumadoras passivas e por fim uma taxa de 25,0% associada às mulheres não fumadoras).

Soares e colaboradores (2007) comprovaram ainda, a existência de alterações significativas da receptividade uterina pelo tabagismo, independentemente do seu efeito sobre a função ovárica. Estes autores descreveram uma taxa de implantação significativamente superior nas fumadoras activas ligeiras, quando comparadas com as moderadas (52,2% *versus* 34,1%, respectivamente;  $P = 0,02$ ).

Do presente trabalho, numa primeira fase, concluiu-se a existência de uma relação directa entre a recolha da informação sobre os hábitos tabágicos das mulheres por intermédio de uma entrevista e os níveis de cotinina presentes no líquido folicular. Com estes dados foi possível avaliar objectivamente a sua exposição ao fumo do tabaco, o que permitiu, com exactidão, a constituição dos três grupos de estudo. Provou-se, deste modo, que os níveis de cotinina são importantes biomarcadores para validação dos hábitos tabágicos.

No grupo das fumadoras activas, verificou-se um aumento significativo da concentração de cotinina no líquido folicular, nas que fumaram o seu último cigarro no dia anterior à punção folicular, o que comprovou a meia vida deste metabolito nos fluidos corporais.

Numa segunda fase do trabalho e feita a análise dos resultados obtidos, não se constatou um impacto negativo do fumo do tabaco, quer inalado de forma activo quer passivo, no sucesso dos tratamentos de Reprodução Medicamente Assistida. Em particular, não se observou um prejuízo nos resultados laboratoriais e clínicos das mulheres fumadoras activas e passivas, nomeadamente ao nível do número de ovócitos recuperados, taxa de fertilização, qualidade embrionária, taxa de gravidez clínica e taxa de implantação alcançadas.

A saúde reprodutiva feminina é uma importante área a ser estudada e desenvolvida, ainda mais quando se acrescenta uma possível constatação que os hábitos tabágicos poderão interferir na fertilidade.

Tal como se referiu anteriormente, aquando da realização das técnicas de Reprodução Medicamente Assistida (RMA), o aspecto morfológico do embrião, um dos critérios amplamente utilizados, não é totalmente fiável. Por este motivo, torna-se imperioso aprofundar esta questão no futuro, através da utilização de marcadores que avaliem a reserva ovárica entre grupos populacionais de mulheres fumadoras, não fumadoras e fumadoras passivas, e consequentemente o número e qualidade dos ovócitos e embriões obtidos.

Destaca-se a hormona anti-Mullerian (AMH) e a contagem do número de folículos antrais (CFA), ao 3º dia do ciclo menstrual por ultrasonografia.

A determinação no soro da hormona AMH pode ser realizada em qualquer dia do ciclo menstrual, por ELISA e reflecte o número de pequenos folículos presentes no ovário. Este “stock” de folículos assegura as ovulações mensais. Desta forma poderia ser possível prever a resposta ovárica e uma eventual gravidez em ciclos RMA.

Pouco ainda se sabe acerca da segregação e regulação da AMH no ovário, e a influência de agentes externos, tais como drogas e compostos tóxicos, pelo que será uma área a ser explorada no futuro.

Seria de igual forma relevante determinar a resposta ovárica pela CFA, uma vez que esta poderá reflectir o número de folículos primordiais remanescentes e, consequentemente, o número de ovócitos recuperados por uma técnica menos invasiva.

A CFA poderia ser avaliada quanto à aparente capacidade de prever as possibilidades de uma gravidez e poderia ser utilizada no aconselhamento prévio dos casais juntamente com marcadores séricos conhecidos, principalmente o AMH, como referido anteriormente.

Um estudo com uma população mais alargada permitiria a análise de resultados, por exemplo, por técnica de inseminação e deste modo determinar em ciclos ICSI o número e ovócitos maduros recuperados, podendo ser correlacionada com a respectiva

reserva ovárica. Poder-se-á, desta forma, sugerir a posterior análise consoante a técnica de inseminação após, preferencialmente, o registo de um maior número de ciclos.

Futuros esforços devem ser realizados de forma a comparar as taxas de gravidez clínicas alcançadas em casais cujo cônjuge é fumador com casais cujo cônjuge não fuma, independentemente dos hábitos tabágicos das mulheres.

No que respeita aos parâmetros clínicos, por um lado, seria esclarecedor estudar os casais que tiveram um resultado positivo para a gravidez clínica, determinando-se as taxas de abortamento espontâneo e de gravidez ectópica.

Por outro lado, embora seja importante a consciência das taxas de sucesso de ciclos RMA, no que diz respeito ao número de ovócitos recuperados e taxas de fertilização, entre outros parâmetros, é igualmente importante que num futuro haja conhecimento do sucesso, traduzido pelo número de crianças nascidas (*baby take home*). Com esta informação, futuros casais ficariam sensibilizados para a influência dos seus hábitos tabágicos no sucesso das técnicas de RMA.

- Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garris G, Mack C, Scott T. (1999). "Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation". *Fertility and Sterility*, **71**:836-842.
- Ambrose JA, Barua RS. (2004). "The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update". *Journal of the American College of Cardiology*, **43**:1731-1737.
- Angelucci S, Ciavardellet D, Di Giuseppe F, Eleuterio E, Sulpizio M, Tiboni GM, Giampietro F, Palumbo P, Di Ilio C. (2006). "Proteome analysis of human follicular fluid". *Biochimica et Biophysica Acta*, **1764**:1775-1785.
- Antckak M, Van Blerkom J. (1999). "Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on development competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains". *Human Reproduction*, **14**:429-447.
- Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. (2002). "Effect of endometriosis on in vitro fertilization". *Fertility and Sterility*, **77**:1148-1155.
- Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guérin JF. (2003). "Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique". *Human Reproduction*, **18**:1023-1028.
- Benowitz NL. (1996). "Cotinine as a biomarker of environmental tobacco exposure". *Epidemiologic Reviews*, **18**:188-196.
- Benowitz NL. (1999). "Biomarkers of environmental tobacco smoke exposure". *Environmental Health Perspectives*, **107**:249-255.
- Bergh C. (2005). "Single embryo transfer: a mini-review". *Human Reproduction*, **20**:323-327.
- Bermúdez MG. (2008). "Gene expression in preimplantation embryos". *Human Reproduction*, **23**:36.



- Bolumar F, Olsen J, Boldsen J, The European Study Group on Infertility and Subfertility. (1996). "Smoking Reduces Fecundity: A European Multicenter Study on Infertility and Subfecundity". *American Journal of Epidemiology*, **143**:578-587.
- Brownson RC, Figgs LW, Caisley LE. (2002). "Epidemiology of Environmental Tobacco Smoke Exposure". *Oncogene*, **21**:7341-7348.
- Bordel R, Laschke MW, Menger MD, Vollmar B. (2006). "Nicotine does not affect vascularization but inhibits growth of freely transplanted ovarian follicles by inducing granulosa cells apoptosis". *Human Reproduction*, **21**:610-617.
- Byrd JC. (1992). "Environmental tobacco smoke: Medical and legal issues". *The Medical Clinics of North America*, **76**:377-398.
- Caraballo R, Giovino G, Pechacek T, Mowery P. (2001). "Factors Associated with Discrepancies between Self-Reports on Cigarette Smoking and Measured Serum Cotinine Levels among Persons Aged 17 Years or Older". *American Journal of Epidemiology*, **153**:807-814.
- CEPA: Air Resources Board (2005). Proposed Identification of Environmental Tobacco Smoke as a Toxic Air Contaminant, consultado da internet em 17 de Fevereiro de 2009 através da fonte, <http://repositories.cdlib.org/tc/surveys/CALEPA2005>.
- Chen C, Cho SN, Damokosh AI, Chen D, Li G, Wang X, Xu X. (2000). "Prospective study of exposure to environmental tobacco smoke and dysmenorrhea". *Environmental Health Perspectives*, **108**:1019-1022.
- Crha I, Hrubá D, Fiala J, Ventruba P, Zaková J, Petrenko M. (2001). "The outcome of infertility treatment by in-vitro fertilisation in smoking and non-smoking women. *Central European Journal of Public Health*, **9**:64-68.
- Crha I, Hrubá D, Ventruba P, Fiala J, Totusek J, Visnova H. (2003). "Ascorbic acid and infertility treatment". *Central European Journal of Public Health*, **11**:63-67.

- Cuadros J, Herrer R, Figueroa M, Moreno J, Ortiz A, Prados F, Rodríguez L, Santalo J, De los Santos M, Tem J. (2007). *Criterios de valoración morfológicos de oocitos, embriones tempranos y blastocitos humanos*. Madrid: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción.
- Curtis KM, Savitz DA, Arbuckle TE. (1997). "Effects of Cigarette Smoking, Caffeine Consumption and Alcohol Intake on Fecundability". *American Journal of Epidemiology*, **146**:32-41.
- Dell'Orco V, Forastiere F, Agabiti N, Corbo GM, Pistelli R, Pacifici R, Zuccaro P, Pizzabiocca A, Rosa M, Altien I, Perucci CA. (1995). "Household and community determinants of exposure to involuntary smoking: A study of urinary cotinine in children and adolescents". *American Journal of Epidemiology*, **142**:419-427.
- Dhar P. (2004). "Measuring tobacco smoke exposure: quantifying nicotine/cotinine concentration in biological samples by colorimetry, chromatography and immunoassay methods". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, **35**:155-168.
- Diário da República, 1ª série — Nº143 — 26 de Julho de 2006.
- Diczfalusy E, Crosignani PG. (1996). "Introduction: From reproductive endocrinology to reproductive health. The short history of a new departure by ESHRE". *Human Reproduction*, **11**:1776-1777.
- Direcção Geral da Saúde. (2001). Saúde Reprodutiva, Planeamento Familiar, Orientações técnicas, nº 9.
- Drakakis P, Loutradis D, Kallianidis K, Liapi A, Milingos S, Makrigiannakis A, Dionyssiou-Asteriou A, Michalas S. (2005). "Small doses of LH activity are needed early in ovarian stimulation for better quality oocytes in IVF-ET". *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **121**:77-80.
- Elenbogen A, Lipitz S, Mashiach A, Dor J, Levran D, Ben-Rafael Z. (1991). "The effect of smoking on the outcome of *in-vitro* fertilization-embryo transfer". *Human Reproduction*, **6**:242-244.

- Eliopoulos C, Klein J, Phan MK, Knie B, Greenwald M, Chitayat D, Koren G. (1994). "Hair concentrations of nicotine and cotinine in women and their newborn infants". *The Journal of the American Medical Association*, **271**:621-623.
- El-Nemr AL, Al-Shawaf T, Sabatini L, Wilson C, Lower AM, Grudzinsas JG. (1998). "Effect of smoking on ovarian reserve and ovarian stimulation in in-vitro fertilization and embryo transfer". *Human Reproduction*, **13**:2192-2198.
- Eskandari N, Cadieux M. (2003). "Reproductive Endocrinology & Infertility" in *Current Obstetric & Gynecologic. Diagnosis & Treatment*, 9th edition, McGrawHill:979-990.
- Eskiocak S, Gozen AS, Yapar SB, Tavas F, Kilic AS, Eskiocak M. (2005). "Glutathione and free sulphydryl content of seminal plasma in healthy medical students during and after exam stress". *Human Reproduction*, **20**:2595-2600.
- Etter JF, Due TV, Perneger TV. (2000). "Saliva Cotinine Levels in Smokers and Nonsmokers". *American Journal of Epidemiology*, **151**: 251-258.
- Etzel A. (1990). "Review of the use of saliva cotinine as a marker of tobacco smoke exposure". *Preventive Medicine*, **19**:190-197.
- Ferraz, L. (2000). "Causa da infertilidade masculina", in *Andrologia Clínica*, Porto: Sociedade Portuguesa de Andrologia, 59-64.
- Freour T, Masson D, Mirallie S, Jean M, Bach K, Dejoie T, Barriere P. (2008). "Active smoking compromises IVF outcome and affects ovarian reserve". *Reproductive Biomedicine Online*, **16**:96-102.
- Fuentes A, Muñoz A, Barnhart K, Arguello B, Díaz M, Pommer R. (2008). "Recent cigarette smoking and assisted technologies outcome". *Fertility and Sterility*, (*in press*).
- Gane WQ, Man SF, Sin DD. (2005). "The interactions between cigarette smoking and reduced lung function on systemic inflammation". *Chest*, **127**:558-564.
- Gerris J, De Neubourg D, Mangelshots K, Van Royen E, Van de Meerssche M, Valkenburg M. (1999). "Prevention of twin pregnancy after in-vitro fertilization or

intracytoplasmatic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomizes clinical trial". *Human Reproduction*, **14**:2581-2587.

Greenhouse S, Rankin T, Dean J. (1998). "Genetic causes of female infertility: targeted mutagenesis in mice". *American Journal of Human Genetics*, **62**:1282-1287.

Hammadeh ME, Al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, Kupker D, Diedrich K, Schmidt W. (1996). "The effect of chromatin condensation taniline blue staining and morphology (strict criteria) of human sperm on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme". *Human Reproduction*, **11**:2468-2471.

Harrison K, Breen T, Hennessey J. (1990). "The effect of patient smoking habit on the outcome of IVF and GIFT treatment". *The Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology*, **30**:340-342.

Heffner LJ. (2004). "Advanced maternal age – How old is too old?". *New England Journal of Medicine*, **351**:1927-1929.

Heffner LJ. (2001). "O Ciclo menstrual" in *Compêndio da Reprodução Humana*, Instituto Piajet:65-68.

Homan GF, Davies M, Norman R. (2007). "The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review". *Human Reproduction Update*, **13**:209-223.

Hruska KS, Furth PA, Seifer DB, Sharara FI, Flaws JA. (2000). "Environmental factors in infertility". *Clinical Obstetrics and Gynecology*, **43**:821-829.

Hughes EG, Yeo J, Claman P, Younglai EV, Sagle MA, Daya S, Collins JA. (1994). "Cigarette smoking and the outcomes of in vitro fertilization: measurement of effect size and levels of action". *Fertility and Sterility*, **62**:807-814.

Hull M, North K, Taylor H, Farrow A, Ford W, Christopher L. (2000). "Delayed conception and active and passive smoking". *Fertility and Sterility*, **74**:725-733.

Jacob PJ, Benowitz NL, Shulgin AT. (1988). "Recent studies of nicotine metabolism in humans". *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **30**:249-253.

- Jaakkola MS, Jaakkola JJK. (1997). "Assessment of exposure to environmental tobacco smoke". *European Respiratory Journal*, **10**:2384-2397.
- Joesbury KA, Edirisinghe WR, Phillips MR, Yovich JL. (1998). "Evidence that male smoking affects the likelihood of a pregnancy following IVF treatment: application of the modified cumulative embryo score". *Human Reproduction*, **13**:1506-1513.
- Jordanov JS. (1990). "Cotinine concentrations in amniotic fluid and urine of smoking, passive smoking and non-smoking pregnant women at term and in the urine of their neonates on 1st day of life". *European Journal of Pediatrics*, **149**:734-737.
- Junqueira LC, Carneiro J. (2008). "Aparelho Reprodutor Feminino" in *Histologia básica*, 11ª edição, Guanabara Koogan:431-451.
- Kapoor D, Jones TH. (2005). "Smoking and hormones in health and endocrine disorders". *European Journal of Endocrinology*, **152**:491-499.
- Klonoff-Cohen H, Natarajan L, Marrs R, Yee B. (2001). "Effects of female and male smoking on success rates of IVF and gamete intra-Fallopian transfer". *Human Reproduction*, **16**:1382-1390.
- Lambert-Messerlian GM, Harlow BL. (2006). "The influence of depression, body mass index, and smoking on serum inhibin B levels in late reproductive-aged women". *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **91**:1496-1500.
- Ludwig M. (2003). "Endocrinology of Infertile Patients" in *How to Improve Results in Assisted Reproduction Technology*, Munich: Medifact-Publishing:11-25.
- Kattea S, Chen C. (2004). "Development potential of human pronuclear zygotes in relation to their pronuclear orientation". *Human Reproduction*, **19**:294-299.
- Kharrazi D, Delorenze GN, Kaufman FL, Eskenazi B, Bernert JT, Graham S, Pearl M, Pirkle J. (2004). "Environmental tobacco smoke and pregnancy outcome". *Epidemiology*, **15**:660-670.
- Krisher RL. (2004). "The effect of oocyte quality on development". *Journal of Animal Science*, **82**:E14-E23.

- Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. (2003). "Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay". *Fertility and Sterility*, **80**:895-902.
- Lintsen AME, Pasker-de-Jong PCM, De Boer EJ, Burger CW, Jansen CAM, Braat DDM, Van Leeuwen FE on behalf of the OMEGA project group. (2005). "Effects of subfertility cause, smoking and body weight on the success rate IVF". *Human Reproduction*, **20**:1867-1875.
- McCann MF, Irwin DE, Walton LA, Hulka BS, Morton JL, Axelrad CM. (1992). "Nicotine and cotinine in the cervical mucus of smokers, passive smokers, and non-smokers". *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, **1**:125-129.
- Meeker JD, Missmer SA, Cramer DW, Hauser R. (2007). "Maternal exposure to second-hand tobacco smoke and pregnancy outcome among couples undergoing assisted reproduction". *Human Reproduction*, **22**:337-345.
- Miceli F, Minici F, Tropea A, Catino T, Orlando MT, Giuseppina L, Sagnella F, Tiberi F, Bompiani A, Mancuso S, Lanzone A, Apa R. (2005). "Effects of nicotine on human luteal cells in vitro: a possible role on reproductive outcome for smoking women". *Biology of Reproduction*, **72**:628-632.
- Michelmann H, Gilbhard G. (2003). Morphological scoring and actual status of blastocyst transfer, in *How to Improve Results in Assisted Reproduction Technology*. Munich: Medifact-Publishing:27-31.
- Ministério da Saúde. (2000). "Inquérito Nacional de Saúde 1998/1999": Lisboa: Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge.
- Motejlek K, Palluch F, Neulen J, Grummer R. (2006). "Smoking impairs angiogenesis during maturation of human oocytes". *Fertility and Sterility*, **86**:186-191.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, Cohen J, Sable D. (2003). "Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy". *Reproductive Biomedicine Online*, **7**:91-97.

- Neal MS, Hughes EG, Holloway AC, Foster WG. (2005). "Sidestream smoking is equally as damaging as mainstream smoking on IVF outcomes". *Human Reproduction*, **20**:2531-2535.
- Nemr A, Al-Shawaf T, Sabatini L, Wilson C, Lower AM, Grudzinskas HG. (1998). "Effect of smoking on ovarian reserve and ovarian stimulation in in-vitro fertilisation and embryo transfer". *Human Reproduction*, **13**:2192-2198.
- Nyboe-Andersen A, Gianaroli L, Nygren KG. (2004). "Assisted reproductive technology in Europe, 2000. Results from European registers by ESRHE". *Human Reproduction*. **19**:490-503.
- Nyboe-Andersen A, Goossens V, Bhattacharya S, Ferrarretti AP, Kupka MS, Mouzon J, Nygren KG, The European IVF-monitoring (EIM) Consortium, for European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). (2009). "Assisted Reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registered by ESHRE". *Human Reproduction*, **1**:1-21.
- Oddze C, Dubus JC, Badier M, Thirion X, Pauli AM, Pastor J, Bruguerolle B.(1999). "Urinary cotinina exposure to parental smoking in a population of children of asthma". *Clinical Chemistry*, **45**:505-509.
- Olivennes F, Frydman R. (1998). "Friendly IVF: the way of the future?". *Human Reproduction*, **13**:1121-1124.
- Organização Mundial de Saúde. (1996). Tobacco: the twentieth century's epidemic. Consultado da internet em 15 de Junho de 2008 através da fonte <http://www.who.org>.
- Padilla S, Garcia JE. (1989). "Effect of maternal age and number of in vitro fertilization procedures of pregnancy outcome". *Fertility and Sterility*, **52**:270-273.
- Pacifici R, Gandini L, Lenzi A, Passa AR, Pichini S, Rosa M, Zuccaro P, Dondero F. (1995). "Environmental Tobacco-Smoke - Nicotine and Cotinine Concentration in Semen". *Environmental Research*, **68**:69-72.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A. (1992). "Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte". *Lancet*, **340**:17-18.

- Paszkowski T, Clark RN, Hornstein MD. (2002). "Smoking induces oxidative stress inside Gaafian follicle". *Human Reproduction*, **17**:921-925.
- Pattinson HA, Taylor PJ, Pattinson MH. (1991). "The effect of cigarette smoking on ovarian function and early pregnancy outcome of in vitro fertilization treatment". *Fertility and Sterility*, **55**:780-783.
- Pazzini C, Scheffer S, Scheffer J. (2007). "Estresse, sua influência nos resultados de fecundação assistida". *Journal Brasileiro de Reprodução Assistida*, **11**:32-35.
- Remohí J, Simón C, Pellicer A, Bonilla. (2002). "Esterilidad e infertilidad: aproximación a su incidencia y a la demanda posible de servicios" in *Reproducción humana*. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana:235-245.
- Pelink MJ, De vos M, Dekens M. (1998). "Embryos cultured *in vitro* with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human in-vitro fertilization and intracytoplasmatic sperm injection". *Human Reproduction*, **13**:960-963.
- Plachot M, Mandelbaum J. (1990). "Oocyte maturation, fertilization and embryonic growth *in vitro*". *British Medical Bulletin*, **46**:663-690.
- Phipps WR, Cramer DW, Schiff I, Belisle S, Stillman R, Albrecht B, Gibson M, Berger MJ, Wilson E. (1987). "The association between smoking and female infertility as influenced by cause of the infertility". *Fertility and Sterility*, **48**:377-382.
- Practice Committee of the American Society for reproductive Medicine. (2004). "Smoking and Infertility". *Fertility and Sterility*, **81**:1181-1186.
- Racowsky C, Combelles C, Nureddin A, Pan Y, Finn A, Miles L, Gales S, O'Leary T, Jackson K. (2003). "Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability". *Reproductive Biomedicine Online*, **6**:323-31.
- Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S, Sapienza F, Baroni E, Greco E. (2005). "Significance of morphological attributes of the early embryo". *Reproductive BioMedicine Online*, **10**:669-681.



- Rickert WS. (1999). "Environmental tobacco smoke: properties, measurement techniques and applications", consultado da internet em 19 de Novembro de 2008 através da fonte <http://tobacco.who.int>.
- Rosevear SK, Holt DW, Lee TD, Ford WCL, Wardle PG, Hull MGR. (1992). "Smoking and decreased fertilisation rates in vitro". *Lancet*, **340**:1195-1196.
- Rossi-Ferragut L, Iaconelli A, Aoki T, Rocha C, Medeiros AR, Santos D, Pasqualotto F, Borges E. (2001). "Zygote morphology scoring in male and female factor in ICSI cycles". *Human Reproduction*. **16**:44.
- Roth LK, Taylor HS. (2001). "Risks of smoking to reproductive health: Assessment of women's knowledge". *American Journal of Obstetric Gynecology*, **184**:934-939.
- Sanchez R, Stalf T, Khanaga O, Turley H, Gips H, Schill WB. (1996). "Sperm selection methods for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and andrological patients". *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **13**:228-233.
- Scherer G, Richter E. (1997). "Biomonitoring exposure to environmental tobacco smoke (ETS): a critical reappraisal". *Human and Experimental Toxicology*, **16**:449-459.
- Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. (2000). "The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation". *Human Reproduction*, **15**:2394-2403.
- Scott L. (2002). "Pronuclear orientation polar body placement and embryo quality". *European Society of Human Reproduction and Embryology, SIG Embryology Course 2*.
- Scott L, Finn A, Leary TO, Mclellan S, Hill J. (2007). "Morphological parameters of early cleavage-stage embryo that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates". *Human Reproduction*, **22**:230-240.
- Sharara FI, Beatse SN, Leonardi MR, Navot D, Scott RT. (1994). "Cigarette smoking accelerates the development of diminished ovarian reserve as evidenced by the clomiphene citrate challenge test". *Fertility and Sterility*, **62**:257-262.

- Shoukir Y, Chardonens D, Campana A, Sakkas D. (1998). "Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence?". *Human Reproduction*, **13**:1632-1637.
- Simón C, Gutiérrez A, Vidal A, De los Santos MJ, Tarín JJ, Remohí J, Pellicer A. (1994). "Outcomes of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation". *Human Reproduction*, **9**:725-729.
- Speroff L, Fritz MA. (2005). "The ovary – Embryology and development" and "Regulations of the menstrual cycle" in *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, 7th edition, Lippincott Williams & Wilkins:97-109;187-231.
- Sharara FI, Beatse SN, Leonardi MR, Navot D, Scott RT. (1994). "Cigarette smoking accelerates the development of diminished ovarian reserve as evidenced by the clomiphene citrate challenge test". *Fertility and Sterility*, **62**:257-262.
- Sher G, Keskinetepe L, Fisch JD, Acacio BA, Ahlering P, Batzofin J, Ginsburg M. (2005). "Soluble human leukocyte antigen G expression in phase I culture media at 46 hours after fertilization predicts pregnancy and implantation from day 3 embryo transfer". *Fertility and Sterility*. **83**:1410-1413.
- Shiloh H, Lahav-Baratz S, Koifman M, Ishai D, Bidder D, Weiner-Meganz Z, Dirnfeld M. (2004). "The impact of cigarette smoking on zona pellucida thickness of oocytes and embryos prior to transfer into the uterine cavity". *Human Reproduction*, **19**:157-159.
- Soares SR, Simon C, Remohi J, Pellicer A. (2007). "Cigarette smoking affects uterine receptiveness". *Human Reproduction*, **22**:543-547.
- Stephoe PC, Edwards R. (1978). "Birth after the reimplantation of a human embryo". *Lancet*, **2**:366.
- Sterzik K, Strehler E, De SM, Trumpp N, Abt M, Rosenbusch B, Schneider A. (1996). "Influence of smoking on fertility in women attending an in vitro fertilization program". *Fertility and Sterility*, **65**:810–814.

- Swan GE, Habina K, Means B, Jobe JB, Esposito JL. (1993). "Saliva cotinine and recent smoking – evidence for a non-linear relationship". *American Journal of Public Health*, **108**:779-783
- Talbot P, Riveles K. (2005). "Smoking and reproduction: the oviduct as a target of cigarette smoke". *Reproductive Biology and Endocrinology*, **3**:52-58.
- Tesarik J, Mendoza C, Greco E. (2002). "Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI". *Human Reproduction*, **17**:184-189.
- Terriou P, Sapin C, Giorgetti C, Hans E, Spach JL, Roulier R. (2001). "Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age". *Fertility and Sterility*, **75**:525-531.
- Testart J. (1994). *A Procriação pela Medicina*. Lisboa: Instituto Piaget.
- Tiboni GM, Bucciarelli T, Giampietro F, Sulpizio M, Di IC. (2004). "Influence of cigarette smoking on vitamin E, vitamin A, beta-carotene and lycopene concentrations in human pre-ovulatory follicular fluid". *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, **17**:389-393.
- Thaqi A, Franke K, Merkel G, Wichmann HE, Heinrich J. (2005). "Biomarkers of exposure to passive smoking of school children: frequency and determinants". *Indoor Air*, **15**:302-310.
- The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2005). "Smoking and Infertility". *Fertility and Sterility*, **82**:S62-S67.
- Trapp M, Kemeter P, Feichtinger W. (1986). "Smoking and in-vitro fertilization". *Human Reproduction*, **1**:357-358.
- Traveres B. (1992). "Risks associated with assisted conception". *British Medical Journal*, **305**:50-51.
- UDDHHS. (2005). "Assisted Reproductive Technology, Success Rates": National Summary and Fertility Clinical Reports. U.S. Department of Health and Human Services –

Centers of disease Control and Prevention, consultado da internet em 05 de Dezembro de 2008 através da fonte <http://www.cdc.gov/ART/ART2005/index.htm>.

USDHHS. (2006). The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General. U.S. Department of Health and Human Services - Office on Smoking and Health, consultado da internet em 17 de Fevereiro de 2009, através da fonte [http://www.cdc.gov/tobacco/data\\_statistics/sgr/sgr\\_2006/index.htm](http://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/sgr/sgr_2006/index.htm).

Vander A, Sherman J, Luciano D. (2001). "Reproduction" in *Human Physiology: The mechanisms of body function*, 8th edition, McGrawHill:635-679

Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Laureys I, Ryckaert G, Gerris J. (2001). "Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model". *Human Reproduction*, **16**:326-332.

Van Voorhis BJ, Syrop CH, Hammitt DG, Dunn MS, Snyder GD. (1992). "Effects of smoking on ovulation induction for assisted reproductive techniques". *Fertility and Sterility*, **58**:981-985.

Van Voorhis BJ, Dawson JD, Stovall DW, Sparks AET, Syrop CH. (1996). "The effects of smoking on ovarian function and fertility during assisted reproduction cycles". *Obstetrics and Gynecology*, **88**:785-791.

Vartiainen E, Seppala T, Lillsunde P, Puska P. (2002). "Validation of self reported smoking by serum cotinine measurement in a community-based study". *Journal of Epidemiology and Community Health*, **56**:160-170.

Velloso JCR, Khalil NM, Fonseca LM, Brunetti IL, Oliveira OMMF. (2007). "Does cotinine act upon reactive oxygen species and peroxidases?". *Eclética Química São Paulo*, **32**:65-70.

Verlinsky Y, Cohen J, Munné S, Gianaroli L, Simpson JL, Ferraretti AP, Kuliev A. (2004). "Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis". *Fertility and Sterility*, **82**:302-303.

- Vilksa S, Tiitinen A, Hydén-Granskog C, Hovatta O. (1999). "Elective transfer of one embryo results in an acceptable pregnancy rate and eliminates the risk of multiple birth." *Human Reproduction*, **14**:2392-2395.
- Vine MF, Hulka BS, Margolin BH, Truong YK, Hu PC, Schramm MM, Griffith JD, McCann M, Everson RB. (1993). "Cotinine concentrations in semen, urine, and blood of smokers and nonsmokers". *American Journal of Public Health*, **83**:1335-1338.
- Vrsanská S, Nagyová E, Mlynarciková A, Ficková M, Kolena J. (2003). "Components of cigarette smoke inhibit expansion of oocyte-cumulus complexes from porcine follicles". *Physiological Research*, **52**:383-387.
- Weigert M, Hofstetter G, Kaipf D, Gottlich H, Krischker U, Bichler K, Poehl M, Feichtinger W. (1999). "The effect of smoking on oocyte quality and hormonal parameters of patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer". *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **16**:287-293.
- Winkelstein ML, Tarzian A, Wood RA. (1997). "Parental smoking behaviour and passive smoke exposure in children with asthma". *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, **78**:419-423.
- Wittemer C, Bettahar-Lebugle L, Ohl J, Rongières C, Nisand I, Gerlinger P. (2000). "Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection". *Human Reproduction*, **15**:2591-2597.
- Wright KP, Trimarchi JR, Allsworth J, Keefe D. (2006). "The effect of female tobacco smoking on IVF outcomes". *Human Reproduction*, **21**(11):2930-2934.
- World Health Organization. (1999). *WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*, 3rd edition. Cambridge: Cambridge University Press:1-28.
- Wu FY, Chiu HT, Wu HD, Lin CJ, Lai JS, Kuo HW. (2008). "Comparison of urinary and plasma cotinine levels during the three trimesters of pregnancy". *Pediatric Perinatal Epidemiology*, **22**:296-301.

- Yang Q, Wen SW, Leade A, Chen XK, Lipson J, Walker M. (2007). "Paternal age and birth defects: how strong s the association?". *Human Reproduction*, **22**:696-701.
- Younglai EV, Holloway AC, Foster WG. (2005). "Environmental and occupational factors affecting fertility and IVF success". *Human Reproduction Update*, **11**:43-57.
- Zenzes MT, Reed TE, Wang P, Klein J. (1996). "Cotinine, a major metabolite of nicotine, is detectable in follicular fluids of passive smokers in in vitro fertilization therapy". *Fertility and Sterility*, **66**:614-619.
- Zenzes MT, Reed TE, Casper RF. (1997). "Effects of cigarette smoking and age on the maturation of human oocytes". *Fertility and Sterility*, **12**:1736-1741.
- Zenzes MT, Reed TE. (1998). "Interovarian differences in levels of cotinine, a major metabolite of nicotine, in women undergoing IVF who are exposed to cigarette smoke". *Physiology*, **15**:99-103.
- Zenzes MT. (2000). "Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos". *Human Reproduction Update*, **6**:122-131.
- Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. (1997). "Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization". *Human Reproduction*, **12**:1545-1549.
- Ziebe S, Loft A, Petersen JH, Andersen AG, Linfenberg S, Petersen K, Andersen AN. (2001). "Embryo quality and developmental potential is compromised by age". *Acta Obstetrícia et Gynecologia Scandinavica*, **80**:169-174.
- Ziztmann M, Rolf C, Nordhoff V, Schrader G, Rickert-Fohring M, Gassner P, Behre HM, Greb RR, Kiesel L, Nieschlag E. (2003). "Male smokers have a decreased success rate for in vitro fertilization and intracytoplasmatic sperm injection". *Fertility and Sterility*, **79**:1550-1554.
- Zollner U, Zollner KP, Hartl G, Dietl J, Steck T. (2002). "The use of detailed zygote score after ICF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience". *Human Reproduction*, **17**:1327-1333.

## VALORES DE REFERÊNCIA (WHO, 1999)

Parâmetro	Valor Normal
Volume	= 2 ml
Cor	Branco grisalho
Cheiro	<i>Sui generis</i>
Viscosidade	Normal
Liquefacção	Completa aos 60 minutos
pH	= 7,2
Concentração (nº de espermatozóides/ml)	= 20 x 10 <sup>6</sup>
Nº total de espermatozóides	= 40 x 10 <sup>6</sup> no ejaculado
Motilidade	
Progressão rápida	= 25%
Progressão rápida + Progressão lenta	= 50%
Morfologia normal	= 15%
Vitalidade	= 50%
Teste de hipoosmolaridade	> 60%

## ASSEMBLEIA DA REPÚBLICA

### Lei n.º 32/2006

de 26 de Julho

#### Procriação medicamente assistida

A Assembleia da República decreta, nos termos da alínea c) do artigo 161.º da Constituição, o seguinte:

### CAPÍTULO I

#### Disposições gerais

##### Artigo 1.º

###### Objecto

A presente lei regula a utilização de técnicas de procriação medicamente assistida (PMA).

##### Artigo 2.º

###### Âmbito

A presente lei aplica-se às seguintes técnicas de PMA:

- a) Inseminação artificial;
- b) Fertilização *in vitro*;
- c) Injecção intracitoplasmática de espermatozóides;
- d) Transferência de embriões, gâmetas ou zigotos;
- e) Diagnóstico genético pré-implantação;
- f) Outras técnicas laboratoriais de manipulação gamética ou embrionária equivalentes ou subsidiárias.

##### Artigo 3.º

###### Dignidade e não discriminação

As técnicas de PMA devem respeitar a dignidade humana, sendo proibida a discriminação com base no património genético ou no facto de se ter nascido em resultado da utilização de técnicas de PMA.

##### Artigo 4.º

###### Condições de admissibilidade

1 — As técnicas de PMA são um método subsidiário, e não alternativo, de procriação.

2 — A utilização de técnicas de PMA só pode verificar-se mediante diagnóstico de infertilidade ou ainda, sendo caso disso, para tratamento de doença grave ou do risco de transmissão de doenças de origem genética, infecciosa ou outras.

##### Artigo 5.º

###### Centros autorizados e pessoas qualificadas

1 — As técnicas de PMA só podem ser ministradas em centros públicos ou privados expressamente autorizados para o efeito pelo Ministro da Saúde.

2 — São definidos em diploma próprio, designadamente:

- a) As qualificações exigidas às equipas médicas e ao restante pessoal de saúde;
- b) O modo e os critérios de avaliação periódica da qualidade técnica;
- c) As situações em que a autorização de funcionamento pode ser revogada.

##### Artigo 6.º

###### Beneficiários

1 — Só as pessoas casadas que não se encontrem separadas judicialmente de pessoas e bens ou separadas de facto ou as que, sendo de sexo diferente, vivam em condições análogas às dos cônjuges há pelo menos dois anos podem recorrer a técnicas de PMA.

2 — As técnicas só podem ser utilizadas em benefício de quem tenha, pelo menos, 18 anos de idade e não se encontre interdito ou inabilitado por anomalia psíquica.

##### Artigo 7.º

###### Finalidades proibidas

1 — É proibida a clonagem reprodutiva tendo como objectivo criar seres humanos geneticamente idênticos a outros.

2 — As técnicas de PMA não podem ser utilizadas para conseguir melhorar determinadas características não médicas do nascituro, designadamente a escolha do sexo.

3 — Exceptuam-se do disposto no número anterior os casos em que haja risco elevado de doença genética ligada ao sexo, e para a qual não seja ainda possível a detecção directa por diagnóstico pré-natal ou diagnóstico genético pré-implantação, ou quando seja ponderosa a necessidade de obter grupo HLA (*human leukocyte antigen*) compatível para efeitos de tratamento de doença grave.

4 — As técnicas de PMA não podem ser utilizadas com o objectivo de originarem quimeras ou híbridos.

5 — É proibida a aplicação das técnicas de diagnóstico genético pré-implantação em doenças multifactoriais onde o valor preditivo do teste genético seja muito baixo.

##### Artigo 8.º

###### Maternidade de substituição

1 — São nulos os negócios jurídicos, gratuitos ou onerosos, de maternidade de substituição.

2 — Entende-se por «maternidade de substituição» qualquer situação em que a mulher se disponha a suportar uma gravidez por conta de outrem e a entregar a criança após o parto, renunciando aos poderes e deveres próprios da maternidade.

3 — A mulher que suportar uma gravidez de substituição de outrem é havida, para todos os efeitos legais, como a mãe da criança que vier a nascer.

##### Artigo 9.º

###### Investigação com recurso a embriões

1 — É proibida a criação de embriões através da PMA com o objectivo deliberado da sua utilização na investigação científica.

2 — É, no entanto, lícita a investigação científica em embriões com o objectivo de prevenção, diagnóstico ou terapia de embriões, de aperfeiçoamento das técnicas de PMA, de constituição de bancos de células estaminais para programas de transplantação ou com quaisquer outras finalidades terapêuticas.

3 — O recurso a embriões para investigação científica só pode ser permitido desde que seja razoável esperar que daí possa resultar benefício para a humanidade, dependendo cada projecto científico de apreciação e



decisão do Conselho Nacional de Procriação medicamente Assistida.

4 — Para efeitos de investigação científica só podem ser utilizados:

- a) Embriões criopreservados, excedentários, em relação aos quais não exista nenhum projecto parental;
- b) Embriões cujo estado não permita a transferência ou a criopreservação com fins de procriação;
- c) Embriões que sejam portadores de anomalia genética grave, no quadro do diagnóstico genético pré-implantação;
- d) Embriões obtidos sem recurso à fecundação por espermatozóide.

5 — O recurso a embriões nas condições das alíneas a) e c) do número anterior depende da obtenção de prévio consentimento, expresso, informado e consciente dos beneficiários aos quais se destinavam.

#### Artigo 10.º

##### Doação de espermatozoides, ovócitos e embriões

1 — Pode recorrer-se à dádiva de ovócitos, de espermatozoides ou de embriões quando, face aos conhecimentos médico-científicos objectivamente disponíveis, não possa obter-se gravidez através do recurso a qualquer outra técnica que utilize os gametas dos beneficiários e desde que sejam asseguradas condições eficazes de garantir a qualidade dos gametas.

2 — Os dadores não podem ser havidos como progenitores da criança que vai nascer.

## CAPÍTULO II

### Utilização de técnicas de PMA

#### Artigo 11.º

##### Decisão médica e objecção de consciência

1 — Compete ao médico responsável propor aos beneficiários a técnica de PMA que, cientificamente, se afigure mais adequada quando outros tratamentos não tenham sido bem sucedidos, não ofereçam perspectivas de êxito ou não se mostrem convenientes segundo os preceitos do conhecimento médico.

2 — Nenhum profissional de saúde pode ser obrigado a superintender ou a colaborar na realização de qualquer das técnicas de PMA se, por razões médicas ou éticas, entender não o dever fazer.

3 — A recusa do profissional deve especificar as razões de ordem clínica ou de outra índole que a motivam, designadamente a objecção de consciência.

#### Artigo 12.º

##### Direitos dos beneficiários

São direitos dos beneficiários:

- a) Não ser submetidos a técnicas que não ofereçam razoáveis probabilidades de êxito ou cuja utilização comporte riscos significativos para a saúde da mãe ou do filho;
- b) Ser assistidos em ambiente médico idóneo que disponha de todas as condições materiais e humanas requeridas para a correcta execução da técnica aconselhável;

c) Ser correctamente informados sobre as implicações médicas, sociais e jurídicas prováveis dos tratamentos propostos;

d) Conhecer as razões que motivem a recusa de técnicas de PMA;

e) Ser informados das condições em que lhes seria possível recorrer à adopção e da relevância social deste instituto.

#### Artigo 13.º

##### Deveres dos beneficiários

1 — São deveres dos beneficiários:

a) Prestar todas as informações que lhes sejam solicitadas pela equipa médica ou que entendam ser relevantes para o correcto diagnóstico da sua situação clínica e para o êxito da técnica a que vão submeter-se;

b) Observar rigorosamente todas as prescrições da equipa médica, quer durante a fase do diagnóstico quer durante as diferentes etapas do processo de PMA.

2 — A fim de serem globalmente avaliados os resultados médico-sanitários e psicossociológicos dos processos de PMA, devem os beneficiários prestar todas as informações relacionadas com a saúde e o desenvolvimento das crianças nascidas com recurso a estas técnicas.

#### Artigo 14.º

##### Consentimento

1 — Os beneficiários devem prestar o seu consentimento livre, esclarecido, de forma expressa e por escrito, perante o médico responsável.

2 — Para efeitos do disposto no número anterior, devem os beneficiários ser previamente informados, por escrito, de todos os benefícios e riscos conhecidos resultantes da utilização das técnicas de PMA, bem como das suas implicações éticas, sociais e jurídicas.

3 — As informações constantes do número anterior devem constar de documento, a ser aprovado pelo Conselho Nacional de Procriação medicamente Assistida, através do qual os beneficiários prestam o seu consentimento.

4 — O consentimento dos beneficiários é livremente revogável por qualquer deles até ao início dos processos terapêuticos de PMA.

#### Artigo 15.º

##### Confidencialidade

1 — Todos aqueles que, por alguma forma, tomarem conhecimento do recurso a técnicas de PMA ou da identidade de qualquer dos participantes nos respectivos processos estão obrigados a manter sigilo sobre a identidade dos mesmos e sobre o próprio acto da PMA.

2 — As pessoas nascidas em consequência de processos de PMA com recurso a dádiva de gametas ou embriões podem, junto dos competentes serviços de saúde, obter as informações de natureza genética que lhes digam respeito, excluindo a identificação do dador.

3 — Sem prejuízo do disposto no número anterior, as pessoas aí referidas podem obter informação sobre eventual existência de impedimento legal a projectado casamento, junto do Conselho Nacional de Procriação medicamente Assistida, mantendo-se a confidencialidade acerca da identidade do dador, excepto se este expressamente o permitir.

4 — Sem prejuízo do disposto nos números anteriores, podem ainda ser obtidas informações sobre a identidade do dador por razões ponderosas reconhecidas por sentença judicial.

5 — O assento de nascimento não pode, em caso algum, conter a indicação de que a criança nasceu da aplicação de técnicas de PMA.

### Artigo 16.º

#### Registo e conservação de dados

1 — Aos dados pessoais relativos aos processos de PMA, respectivos beneficiários, dadores e crianças nascidas é aplicada a legislação de protecção de dados pessoais e de informação genética pessoal e informação de saúde.

2 — Em diploma próprio, de acordo com a especificidade dos dados relativos à PMA, é regulamentado, nomeadamente, o período de tempo durante o qual os dados devem ser conservados, quem poderá ter acesso a eles e com que finalidade, bem como os casos em que poderão ser eliminadas informações constantes dos registos.

### Artigo 17.º

#### Encargos

1 — Os centros autorizados a ministrar técnicas de PMA não podem, no cálculo da retribuição exigível, atribuir qualquer valor ao material genético doado nem aos embriões doados.

2 — O recurso às técnicas de PMA no âmbito do Serviço Nacional de Saúde é suportado nas condições que vierem a ser definidas em diploma próprio, tendo em conta o parecer do Conselho Nacional de Procriação medicamente Assistida.

### Artigo 18.º

#### Compra ou venda de óvulos, sémen ou embriões e outro material biológico

É proibida a compra ou venda de óvulos, sémen ou embriões ou de qualquer material biológico decorrente da aplicação de técnicas de PMA.

## CAPÍTULO III

### Inseminação artificial

### Artigo 19.º

#### Inseminação com sémen de dador

1 — A inseminação com sémen de um terceiro dador só pode verificar-se quando, face aos conhecimentos médico-científicos objectivamente disponíveis, não possa obter-se gravidez através de inseminação com sémen do marido ou daquele que viva em união de facto com a mulher a inseminar.

2 — O sémen do dador deve ser criopreservado.

### Artigo 20.º

#### Determinação da paternidade

1 — Se da inseminação a que se refere o artigo anterior vier a resultar o nascimento de um filho, é este havido como filho do marido ou daquele vivendo em

união de facto com a mulher inseminada, desde que tenha havido consentimento na inseminação, nos termos do artigo 14.º, sem prejuízo da presunção estabelecida no artigo 1826.º do Código Civil.

2 — Para efeitos do disposto no número anterior, e no caso de ausência do unido de facto no acto de registo do nascimento, pode ser exibido, nesse mesmo acto, documento comprovativo de que aquele prestou o seu consentimento nos termos do artigo 14.º

3 — Nos casos referidos no número anterior, no registo de nascimento é também estabelecida a paternidade de quem prestou o consentimento nos termos do artigo 14.º

4 — Não sendo exibido o documento referido no n.º 2, lavra-se registo de nascimento apenas com a maternidade estabelecida, caso em que, com as necessárias adaptações, se aplica o disposto nos artigos 1864.º a 1866.º do Código Civil, apenas com vista a determinar a existência de consentimento sério, livre e esclarecido, prestado por qualquer meio, à inseminação e consequente estabelecimento da paternidade de quem prestou o consentimento.

5 — A presunção de paternidade estabelecida nos termos dos n.ºs 1 e 2 pode ser impugnada pelo marido ou aquele que vivesse em união de facto se for provado que não houve consentimento ou que o filho não nasceu da inseminação para que o consentimento foi prestado.

### Artigo 21.º

#### Exclusão da paternidade do dador de sémen

O dador de sémen não pode ser havido como pai da criança que vier a nascer, não lhe cabendo quaisquer poderes ou deveres em relação a ela.

### Artigo 22.º

#### Inseminação *post mortem*

1 — Após a morte do marido ou do homem com quem vivia em união de facto, não é lícito à mulher ser inseminada com sémen do falecido, ainda que este haja consentido no acto de inseminação.

2 — O sémen que, com fundado receio de futura esterilidade, seja recolhido para fins de inseminação do cônjuge ou da mulher com quem o homem viva em união de facto é destruído se aquele vier a falecer durante o período estabelecido para a conservação do sémen.

3 — É, porém, lícita a transferência *post mortem* de embrião para permitir a realização de um projecto parental claramente estabelecido por escrito antes do falecimento do pai, decorrido que seja o prazo considerado ajustado à adequada ponderação da decisão.

### Artigo 23.º

#### Paternidade

1 — Se da violação da proibição a que se refere o artigo anterior resultar gravidez da mulher inseminada, a criança que vier a nascer é havida como filha do falecido.

2 — Cessa o disposto no número anterior se, à data da inseminação, a mulher tiver contraído casamento ou viver há pelo menos dois anos em união de facto com homem que, nos termos do artigo 14.º, dê o seu consentimento a tal acto, caso em que se aplica o disposto no n.º 3 do artigo 1839.º do Código Civil.

## CAPÍTULO IV

Fertilização *in vitro*

## Artigo 24.º

## Princípio geral

1 — Na fertilização *in vitro* apenas deve haver lugar à criação dos embriões em número considerado necessário para o êxito do processo, de acordo com a boa prática clínica e os princípios do consentimento informado.

2 — O número de ovócitos a inseminar em cada processo deve ter em conta a situação clínica do casal e a indicação geral de prevenção da gravidez múltipla.

## Artigo 25.º

## Destino dos embriões

1 — Os embriões que, nos termos do artigo anterior, não tiverem de ser transferidos, devem ser criopreservados, comprometendo-se os beneficiários a utilizá-los em novo processo de transferência embrionária no prazo máximo de três anos.

2 — Decorrido o prazo de três anos, podem os embriões ser doados a outro casal cuja indicação médica de infertilidade o aconselhe, sendo os factos determinantes sujeitos a registo.

3 — O destino dos embriões previsto no número anterior só pode verificar-se mediante o consentimento dos beneficiários originários ou do que seja sobrevivente, aplicando-se, com as necessárias adaptações, o disposto no n.º 1 do artigo 14.º

4 — Não ficam sujeitos ao disposto no n.º 1 os embriões cuja caracterização morfológica não indique condições mínimas de viabilidade.

5 — Aos embriões que não tiverem possibilidade de ser envolvidos num projecto parental aplica-se o disposto no artigo 9.º

## Artigo 26.º

Fertilização *in vitro post mortem*

Se aquele que depositou o seu sêmen ou ovócitos para fins de inseminação em benefício do casal a que pertence vier a falecer, aplica-se, com as necessárias adaptações, o que se dispõe em matéria de inseminação *post mortem* nos artigos 22.º e 23.º

## Artigo 27.º

Fertilização *in vitro* com gâmetas de dador

À fertilização *in vitro* com recurso a sêmen ou ovócitos de dador aplica-se, com as devidas adaptações, o disposto nos artigos 19.º a 21.º

## CAPÍTULO V

## Diagnóstico genético pré-implantação

## Artigo 28.º

## Rastreio de aneuploidias e diagnóstico genético pré-implantação

1 — O diagnóstico genético pré-implantação (DGPI) tem como objectivo a identificação de embriões não portadores de anomalia grave, antes da sua transferência para o útero da mulher, através do recurso a técnicas

de PMA, ou para os efeitos previstos no n.º 3 do artigo 7.º

2 — É permitida a aplicação, sob orientação de médico especialista responsável, do rastreio genético de aneuploidias nos embriões a transferir com vista a diminuir o risco de alterações cromossómicas e assim aumentar as possibilidades de sucesso das técnicas de PMA.

3 — É permitida a aplicação, sob orientação de médico especialista responsável, das técnicas de DGPI que tenham reconhecido valor científico para diagnóstico, tratamento ou prevenção de doenças genéticas graves, como tal considerado pelo Conselho Nacional de Procriação medicamente Assistida.

4 — Os centros de PMA que desejem aplicar técnicas de DGPI devem possuir ou articular-se com equipa multidisciplinar que inclua especialistas em medicina da reprodução, embriologistas, médicos geneticistas, citogeneticistas e geneticistas moleculares.

## Artigo 29.º

## Aplicações

1 — O DGPI destina-se a pessoas provenientes de famílias com alterações que causam morte precoce ou doença grave, quando exista risco elevado de transmissão à sua descendência.

2 — As indicações médicas específicas para possível DGPI são determinadas pelas boas práticas correntes e constam das recomendações das organizações profissionais nacionais e internacionais da área, sendo revistas periodicamente.

## CAPÍTULO VI

## Conselho Nacional de Procriação medicamente Assistida

## Artigo 30.º

## Conselho Nacional de Procriação medicamente Assistida

1 — É criado o Conselho Nacional de Procriação medicamente Assistida, adiante designado por CNPMA, ao qual compete, genericamente, pronunciar-se sobre as questões éticas, sociais e legais da PMA.

2 — São atribuições do CNPMA, designadamente:

a) Actualizar a informação científica sobre a PMA e sobre as técnicas reguladas pela presente legislação;

b) Estabelecer as condições em que devem ser autorizados os centros onde são ministradas as técnicas de PMA, bem como os centros onde sejam preservados gâmetas ou embriões;

c) Acompanhar a actividade dos centros referidos na alínea anterior, fiscalizando o cumprimento da presente lei, em articulação com as entidades públicas competentes;

d) Dar parecer sobre a autorização de novos centros, bem como sobre situações de suspensão ou revogação dessa autorização;

e) Dar parecer sobre a constituição de bancos de células estaminais, bem como sobre o destino do material biológico resultante do encerramento destes;

f) Estabelecer orientações relacionadas com a DGPI, no âmbito dos artigos 28.º e 29.º da presente lei;

g) Apreçar, aprovando ou rejeitando, os projectos de investigação que envolvam embriões, nos termos do artigo 9.º;

h) Aprovar o documento através do qual os beneficiários das técnicas de PMA prestam o seu consentimento;

i) Prestar as informações relacionadas com os dados, nos termos e com os limites previstos no artigo 15.º;

j) Pronunciar-se sobre a implementação das técnicas de PMA no Serviço Nacional de Saúde;

l) Reunir as informações a que se refere o n.º 2 do artigo 13.º, efectuando o seu tratamento científico e avaliando os resultados médico-sanitários e psicossociológicos da prática da PMA;

m) Definir o modelo dos relatórios anuais de actividade dos centros de PMA;

n) Receber e avaliar os relatórios previstos na alínea anterior;

o) Contribuir para a divulgação das técnicas disponíveis e para o debate acerca das suas aplicabilidades;

p) Centralizar toda a informação relevante acerca da aplicação das técnicas de PMA, nomeadamente registo de dados, beneficiários e crianças nascidas;

q) Deliberar caso a caso sobre a utilização das técnicas de PMA para selecção de grupo HLA compatível para efeitos de tratamento de doença grave.

3 — O CNPMA apresenta à Assembleia da República e aos Ministérios da Saúde e da Ciência e Tecnologia um relatório anual sobre as suas actividades e sobre as actividades dos serviços públicos e privados, descrevendo o estado da utilização das técnicas de PMA, formulando as recomendações que entender pertinentes, nomeadamente sobre as alterações legislativas necessárias para adequar a prática da PMA à evolução científica, tecnológica, cultural e social.

### Artigo 31.º

#### Composição e mandato

1 — O CNPMA é composto por nove personalidades de reconhecido mérito que garantam especial qualificação no domínio das questões éticas, científicas, sociais e legais da PMA.

2 — Os membros do CNPMA são designados da seguinte forma:

a) Cinco personalidades eleitas pela Assembleia da República;

b) Quatro personalidades nomeadas pelos membros do Governo que tutelam a saúde e a ciência.

3 — Os membros do Conselho elegem de entre si um presidente e um vice-presidente.

4 — O mandato dos membros do Conselho é de cinco anos.

5 — Cada membro do Conselho pode cumprir um ou mais mandatos.

### Artigo 32.º

#### Funcionamento

1 — O CNPMA funciona no âmbito da Assembleia da República, que assegura os encargos com o seu funcionamento e o apoio técnico e administrativo necessários.

2 — O Conselho estabelece em regulamento interno a disciplina do seu funcionamento, incluindo a eventual criação e composição de uma comissão coordenadora e de subcomissões para lidar com assuntos específicos.

3 — Os membros do CNPMA têm direito a senhas de presença, por cada reunião em que participem, de

montante a definir por despacho do Presidente da Assembleia da República, e, bem assim, a ajudas de custo e a requisições de transporte, nos termos da lei geral.

### Artigo 33.º

#### Dever de colaboração

Todas as entidades públicas, sociais e privadas têm o dever de prestar a colaboração solicitada pelo CNPMA para o exercício das suas competências.

## CAPÍTULO VII

### Sanções

#### SECÇÃO I

#### Responsabilidade criminal

### Artigo 34.º

#### Centros autorizados

Quem aplicar técnicas de PMA fora dos centros autorizados é punido com pena de prisão até 3 anos.

### Artigo 35.º

#### Beneficiários

Quem aplicar técnicas de PMA com violação do disposto no n.º 2 do artigo 6.º é punido com pena de prisão de 2 a 8 anos.

### Artigo 36.º

#### Clonagem reprodutiva

1 — Quem transferir para o útero embrião obtido através da técnica de transferência de núcleo, salvo quando essa transferência seja necessária à aplicação das técnicas de PMA, é punido com pena de prisão de 1 a 5 anos.

2 — Na mesma pena incorre quem proceder à transferência de embrião obtido através da cisão de embriões.

### Artigo 37.º

#### Escolha de características não médicas

Quem utilizar ou aplicar técnicas de PMA para conseguir melhorar determinadas características não médicas do nascituro, designadamente a escolha do sexo, fora dos casos permitidos pela presente lei, é punido com pena de prisão até 2 anos ou com pena de multa até 240 dias.

### Artigo 38.º

#### Criação de quimeras ou híbridos

Quem criar quimeras ou híbridos com fins de PMA é punido com pena de prisão de 1 a 5 anos.

### Artigo 39.º

#### Maternidade de substituição

1 — Quem concretizar contratos de maternidade de substituição a título oneroso é punido com pena de prisão até 2 anos ou pena de multa até 240 dias.

2 — Quem promover, por qualquer meio, designadamente através de convite directo ou por interposta pessoa, ou de anúncio público, a maternidade de subs-

tituição a título oneroso é punido com pena de prisão até 2 anos ou pena de multa até 240 dias.

#### Artigo 40.º

##### Utilização indevida de embriões

1 — Quem, através de PMA, utilizar embriões na investigação e experimentação científicas fora dos casos permitidos na presente lei é punido com pena de prisão de 1 a 5 anos.

2 — Na mesma pena incorre quem proceder à transferência para o útero de embrião usado na investigação e na experimentação científicas fora dos casos previstos na presente lei.

#### Artigo 41.º

##### Intervenções e tratamentos

1 — Às intervenções e tratamentos feitos através de técnicas de PMA por médico ou por outra pessoa legalmente autorizada com conhecimento do médico responsável aplica-se o disposto no artigo 150.º do Código Penal.

2 — As intervenções e tratamentos no âmbito da PMA feitos sem conhecimento do médico responsável ou por quem não esteja legalmente habilitado constituem ofensas à integridade física, puníveis nos termos do Código Penal, de acordo com as lesões provocadas, sem prejuízo de qualquer outra tipificação penal.

#### Artigo 42.º

##### Recolha e utilização não consentida de gâmetas

Quem recolher material genético de homem ou de mulher sem o seu consentimento e o utilizar na PMA é punido com pena de prisão de 1 a 8 anos.

#### Artigo 43.º

##### Violação do dever de sigilo ou de confidencialidade

Quem violar o disposto no artigo 15.º é punido com pena de prisão até 1 ano ou com pena de multa até 240 dias.

### SECÇÃO II

#### Ilícito contra-ordenacional

#### Artigo 44.º

##### Contra-ordenações

1 — Constitui contra-ordenação punível com coima de € 10 000 a € 50 000 no caso de pessoas singulares, sendo o máximo de € 500 000 no caso de pessoas colectivas:

a) A aplicação de qualquer técnica de PMA sem que, para tal, se verifiquem as condições previstas no artigo 4.º;

b) A aplicação de qualquer técnica de PMA fora dos centros autorizados;

c) A aplicação de qualquer técnica de PMA sem que, para tal, se verifiquem os requisitos previstos no artigo 6.º;

d) A aplicação de qualquer técnica de PMA sem que o consentimento de qualquer dos beneficiários conste de documento que obedeça aos requisitos previstos no artigo 14.º

2 — A negligência é punível, reduzindo-se para metade os montantes máximos previstos no número anterior.

### SECÇÃO III

#### Sanções acessórias

#### Artigo 45.º

##### Sanções acessórias

A quem for condenado por qualquer dos crimes ou das contra-ordenações previstos neste capítulo pode o tribunal aplicar as seguintes sanções acessórias:

- a) Injunção judiciária;
- b) Interdição temporária do exercício de actividade ou profissão;
- c) Privação do direito a subsídios, subvenções ou incentivos outorgados por entidades ou serviços públicos;
- d) Encerramento temporário de estabelecimento;
- e) Cessação da autorização de funcionamento;
- f) Publicidade da decisão condenatória.

### SECÇÃO IV

#### Direito subsidiário

#### Artigo 46.º

##### Direito subsidiário

Ao disposto no presente capítulo é aplicável, subsidiariamente, o Código Penal e o regime geral das contra-ordenações.

## CAPÍTULO VIII

### Disposições finais

#### Artigo 47.º

##### Outras técnicas de PMA

À injeção intracitoplasmática de espermatozóides, à transferência de embriões, gâmetas ou zigotos e a outras técnicas laboratoriais de manipulação gamética ou embrionária equivalentes ou subsidiárias aplica-se, com as necessárias adaptações, o disposto no capítulo IV.

#### Artigo 48.º

##### Regulamentação

O Governo aprova, no prazo máximo de 180 dias após a publicação da presente lei, a respectiva regulamentação.

Aprovada em 25 de Maio de 2006.

O Presidente da Assembleia da República, *Jaime Gama*.

Promulgada em 11 de Julho de 2006.

Publique-se.

O Presidente da República, ANÍBAL CAVACO SILVA.

Referendada em 14 de Julho de 2006.

O Primeiro-Ministro, *José Sócrates Carvalho Pinto de Sousa*.

## ANEXO I

## Mapa a que se refere o n.º 1 do artigo 22.º

Designação dos cargos dirigentes	Qualificação dos cargos dirigentes	Grau	Número de lugares
Director de serviços . . .	Direcção intermédia . . .	1.º	2
Chefe de divisão . . . . .	Direcção intermédia . . .	2.º	3

## ANEXO II

## Modelo de cartão de identificação a que alude o artigo 23.º

(a)  REPÚBLICA PORTUGUESA

(b) **Conselho Superior da Magistratura**

Cartão de Identificação N.º \_\_\_\_\_

Nome \_\_\_\_\_

Categoria \_\_\_\_\_

O Juiz – Secretário

(c) \_\_\_\_\_

Fotografia

(Selo Branco)

(c)

**O presente cartão assegura o reconhecimento da qualidade do seu portador como elemento do corpo do pessoal do Conselho Superior da Magistratura**

Assinatura do titular

\_\_\_\_\_

- (a) — Cor verde.  
 (b) — Cor vermelha.  
 (c) — Cor branca.

Largura — 10 cm.  
 Altura — 7 cm.

## Lei n.º 37/2007

de 14 de Agosto

**Aprova normas para a protecção dos cidadãos da exposição involuntária ao fumo do tabaco e medidas de redução da procura relacionadas com a dependência e a cessação do seu consumo.**

A Assembleia da República decreta, nos termos da alínea c) do artigo 161.º da Constituição, o seguinte:

## CAPÍTULO I

## Disposições gerais

## Artigo 1.º

## Objecto

A presente lei dá execução ao disposto na Convenção Quadro da Organização Mundial de Saúde para o Controlo do Tabaco, aprovada pelo Decreto n.º 25-A/2005, de 8 de Novembro, estabelecendo normas tendentes à prevenção do tabagismo, em particular no que se refere à protecção da exposição involuntária ao fumo do tabaco, à regulamentação da composição dos produtos do tabaco, à regulamentação das informações a prestar sobre estes produtos, à embalagem e etiquetagem, à sensibilização e educação para a saúde, à proibição da publicidade a favor do tabaco, promoção e patrocínio, às medidas de redução da procura relacionadas com a dependência e a cessação do consumo, à venda a menores e através de meios automáticos, de modo a contribuir para a diminuição dos riscos ou efeitos negativos que o uso do tabaco acarreta para a saúde dos indivíduos.

## Artigo 2.º

## Definições

Para efeitos da presente lei e demais legislação sobre a prevenção do tabagismo, entende-se por:

- a) «Advertência complementar» qualquer das advertências referidas no anexo II da presente lei;
- b) «Advertência geral» o aviso relativo aos prejuízos para a saúde decorrentes do uso do tabaco, a apor na face mais visível das embalagens de tabaco;
- c) «Alcatrão ou condensado» o condensado de fumo bruto anidro e isento de nicotina;
- d) «Áreas de trabalho em permanência» os locais onde os trabalhadores tenham de permanecer mais de 30 % do respectivo tempo diário de trabalho;
- e) «Embalagem de tabaco» qualquer forma de embalagem individual e qualquer embalagem exterior utilizada na venda a retalho de produtos do tabaco, com excepção das sobreembalagens transparentes;
- f) «Ingrediente» qualquer substância ou componente, que não as folhas e outras partes naturais ou não transformadas da planta do tabaco, utilizado no fabrico ou na preparação de um produto do tabaco e presente no produto final, ainda que em forma alterada, incluindo o papel, o filtro, as tintas e os adesivos;
- g) «Local de trabalho» todo o lugar onde o trabalhador se encontra e em que esteja, directa ou indirectamente, sujeito ao controlo do empregador;

h) «Local de venda de tabaco» qualquer local onde sejam colocados à venda produtos do tabaco;

i) «Nicotina» os alcalóides nicotínicos;

j) «Produto do tabaco» qualquer produto destinado a ser fumado, inalado, chupado ou mascado, desde que seja, ainda que parcialmente, constituído por tabaco, geneticamente modificado ou não;

l) «Produtos do tabaco para uso oral» os produtos que se destinam a uso oral constituídos total ou parcialmente por tabaco sob a forma de pó ou de partículas finas ou qualquer combinação destas formas, nomeadamente os que se apresentam em doses individuais ou pacotes porosos ou sob forma que evoque um género alimentício, com excepção dos produtos para fumar ou mascar;

m) «Publicidade ao tabaco» qualquer forma de comunicação feita por entidades de natureza pública ou privada, no âmbito de uma actividade comercial, industrial, artesanal ou liberal, com o objectivo directo ou indirecto de promover um produto do tabaco ou o seu consumo;

n) «Recinto fechado» todo o espaço limitado por paredes, muros ou outras superfícies e dotado de uma cobertura;

o) «Serviço da sociedade da informação» qualquer serviço prestado à distância, por via electrónica, mediante pedido individual de um destinatário de serviços e contra pagamento de um preço, entendendo-se, nesta conformidade, por:

«À distância» um serviço prestado sem que as partes estejam física e simultaneamente presentes;

«Por via electrónica» um serviço enviado desde a origem e recebido no destino através de instrumentos electrónicos de processamento (incluindo a compressão digital) e de armazenamento de dados, que é inteiramente transmitido, encaminhado e recebido por cabo, rádio, meios ópticos ou outros meios electromagnéticos;

«Mediante pedido individual de um destinatário de serviços» um serviço fornecido por transmissão de dados, mediante pedido individual;

p) «Suporte publicitário» o veículo utilizado para a transmissão da mensagem publicitária;

q) «Tabaco» as folhas, parte das folhas e nervuras das plantas *Nicotiana tabacum* L. e *Nicotiana rustica* L., quer sejam comercializadas sob a forma de cigarro, cigarrilha ou charutos quer picadas para cachimbo ou para a feitura manual de cigarros, seja com a forma de rolo, barra, lâmina, cubo ou placa ou reduzidas a pó ou a grãos;

r) «Televenda de produtos do tabaco» a difusão de ofertas directas ao público, realizada por canais televisivos, com vista ao fornecimento de cigarros ou outros produtos derivados do tabaco, mediante remuneração;

s) «Uso de tabaco» o acto de fumar, inalar, chupar ou mascar um produto à base de tabaco, bem como o acto de fumar, mascar ou inalar os produtos referidos nos n.ºs 8 e 9 do artigo 81.º do Decreto-Lei n.º 566/99, de 22 de Dezembro.

## CAPÍTULO II

### Limitações ao consumo de tabaco

#### Artigo 3.º

##### Princípio geral

O disposto no presente capítulo visa estabelecer limitações ao consumo de tabaco em recintos fechados destina-

dos a utilização colectiva de forma a garantir a protecção da exposição involuntária ao fumo do tabaco.

#### Artigo 4.º

##### Proibição de fumar em determinados locais

1 — É proibido fumar:

a) Nos locais onde estejam instalados órgãos de soberania, serviços e organismos da Administração Pública e pessoas colectivas públicas;

b) Nos locais de trabalho;

c) Nos locais de atendimento directo ao público;

d) Nos estabelecimentos onde sejam prestados cuidados de saúde, nomeadamente hospitais, clínicas, centros e casas de saúde, consultórios médicos, postos de socorros e outros similares, laboratórios, farmácias e locais onde se dispensem medicamentos não sujeitos a receita médica;

e) Nos lares e outras instituições que acolham pessoas idosas ou com deficiência ou incapacidade;

f) Nos locais destinados a menores de 18 anos, nomeadamente infantários, creches e outros estabelecimentos de assistência infantil, lares de infância e juventude, centros de ocupação de tempos livres, colónias e campos de férias e demais estabelecimentos similares;

g) Nos estabelecimentos de ensino, independentemente da idade dos alunos e do grau de escolaridade, incluindo, nomeadamente, salas de aula, de estudo, de professores e de reuniões, bibliotecas, ginásios, átrios e corredores, bares, restaurantes, cantinas, refeitórios e espaços de recreio;

h) Nos centros de formação profissional;

i) Nos museus, colecções visitáveis e locais onde se guardem bens culturais classificados, nos centros culturais, nos arquivos e nas bibliotecas, nas salas de conferência, de leitura e de exposição;

j) Nas salas e recintos de espectáculos e noutros locais destinados à difusão das artes e do espectáculo, incluindo as antecâmaras, acessos e áreas contíguas;

l) Nos recintos de diversão e recintos destinados a espectáculos de natureza não artística;

m) Nas zonas fechadas das instalações desportivas;

n) Nos recintos das feiras e exposições;

o) Nos conjuntos e grandes superfícies comerciais e nos estabelecimentos comerciais de venda ao público;

p) Nos estabelecimentos hoteleiros e outros empreendimentos turísticos onde sejam prestados serviços de alojamento;

q) Nos estabelecimentos de restauração ou de bebidas, incluindo os que possuam salas ou espaços destinados a dança;

r) Nas cantinas, nos refeitórios e nos bares de entidades públicas e privadas destinados exclusivamente ao respectivo pessoal;

s) Nas áreas de serviço e postos de abastecimento de combustíveis;

t) Nos aeroportos, nas estações ferroviárias, nas estações rodoviárias de passageiros e nas gares marítimas e fluviais;

u) Nas instalações do metropolitano afectas ao público, designadamente nas estações terminais ou intermédias, em todos os seus acessos e estabelecimentos ou instalações contíguas;

v) Nos parques de estacionamento cobertos;

x) Nos elevadores, ascensores e similares;

z) Nas cabinas telefónicas fechadas;

aa) Nos recintos fechados das redes de levantamento automático de dinheiro;

ab) Em qualquer outro lugar onde, por determinação da gerência ou de outra legislação aplicável, designadamente em matéria de prevenção de riscos ocupacionais, se proíba fumar.

2 — É ainda proibido fumar nos veículos afectos aos transportes públicos urbanos, suburbanos e interurbanos de passageiros, bem como nos transportes rodoviários, ferroviários, aéreos, marítimos e fluviais, nos serviços expressos, turísticos e de aluguer, nos táxis, ambulâncias, veículos de transporte de doentes e teleféricos.

## Artigo 5.º

### Excepções

1 — Sem prejuízo do disposto na alínea d) do n.º 1 do artigo anterior, podem ser criadas áreas exclusivamente destinadas a pacientes fumadores em hospitais e serviços psiquiátricos, centros de tratamento e reabilitação e unidades de internamento de toxicodependentes e de alcoólicos desde que satisfaçam os requisitos das alíneas a), b) e c) do n.º 5.

2 — Sem prejuízo do disposto no artigo anterior, podem ser criadas nos estabelecimentos prisionais unidades de alojamento, em celas ou camaratas, para reclusos fumadores desde que satisfaçam os requisitos das alíneas a), b) e c) do n.º 5, sendo ainda admitido fumar nas áreas ao ar livre.

3 — Nos locais mencionados nas alíneas a), b), c), d), e), h), i), j), l), m), n), o), p), q), r) e t) do n.º 1 do artigo anterior, bem como nos locais mencionados na alínea g) do n.º 1 do artigo anterior que integrem o sistema de ensino superior, é admitido fumar nas áreas ao ar livre.

4 — Nos locais mencionados na alínea s) do n.º 1 do artigo anterior é admitido fumar nas áreas ao ar livre, com excepção das zonas onde se realize o abastecimento de veículos.

5 — Nos locais mencionados nas alíneas a), b), e), j), l), n), o), p) e t) do n.º 1 do artigo anterior, bem como nos locais mencionados na alínea g) do n.º 1 do referido artigo que integrem o sistema de ensino superior e nos locais mencionados na alínea h) do n.º 1 do mesmo artigo que não sejam frequentados por menores de 18 anos, pode ser permitido fumar em áreas expressamente previstas para o efeito desde que obedeçam aos requisitos seguintes:

a) Estejam devidamente sinalizadas, com afixação de dísticos em locais visíveis, nos termos do disposto no artigo 6.º;

b) Sejam separadas fisicamente das restantes instalações, ou disponham de dispositivo de ventilação, ou qualquer outro, desde que autónomo, que evite que o fumo se espalhe às áreas contíguas;

c) Seja garantida a ventilação directa para o exterior através de sistema de extracção de ar que proteja dos efeitos do fumo os trabalhadores e os clientes não fumadores.

6 — Nos locais mencionados na alínea q) do n.º 1 do artigo anterior com área destinada ao público inferior a 100 m<sup>2</sup>, o proprietário pode optar por estabelecer a permissão de fumar desde que obedeça aos requisitos mencionados nas alíneas a), b) e c) do número anterior.

7 — Nos locais mencionados na alínea g) do n.º 1 do artigo anterior com área destinada ao público igual ou superior a 100 m<sup>2</sup> podem ser criadas áreas para fumadores,

até um máximo de 30 % do total respectivo, ou espaço fisicamente separado não superior a 40 % do total respectivo, desde que obedeçam aos requisitos mencionados nas alíneas a), b) e c) do n.º 5, não abranjam as áreas destinadas exclusivamente ao pessoal nem as áreas onde os trabalhadores tenham de trabalhar em permanência.

8 — Nos locais mencionados na alínea p) do n.º 1 do artigo anterior podem ser reservados andares, unidades de alojamento ou quartos para fumadores, até um máximo de 40 % do total respectivo, ocupando áreas contíguas ou a totalidade de um ou mais andares, desde que obedeçam aos requisitos mencionados nas alíneas a), b) e c) do n.º 5.

9 — Sem prejuízo do disposto no n.º 2 do artigo anterior e das limitações constantes dos regulamentos emitidos pelas empresas transportadoras ou pelas capitânias de portos, é permitido fumar nas áreas descobertas nos barcos afectos a carreiras marítimas ou fluviais.

10 — Sem prejuízo do disposto no n.º 6, a opção pela permissão de fumar deve, sempre que possível, proporcionar a existência de espaços separados para fumadores e não fumadores.

11 — A definição das áreas para fumadores cabe às entidades responsáveis pelos estabelecimentos em causa, devendo ser consultados os respectivos serviços de segurança, higiene e saúde no trabalho e as comissões de segurança, higiene e saúde no trabalho, ou, na sua falta, os representantes dos trabalhadores para a segurança, higiene e saúde no trabalho.

## Artigo 6.º

### Sinalização

1 — A interdição ou o condicionamento de fumar no interior dos locais referidos nos artigos 4.º e 5.º devem ser assinalados pelas respectivas entidades competentes, mediante a afixação de dísticos com fundo vermelho, conformes ao modelo A constante do anexo I da presente lei e que dela faz parte integrante, sendo o traço, incluindo a legenda e a cruz, a branco e com as dimensões mínimas de 160 mm x 55 mm.

2 — As áreas onde é permitido fumar são identificadas mediante afixação de dísticos com fundo azul e com as restantes características indicadas no número anterior, conformes ao modelo B constante do anexo I.

3 — Aos dísticos referenciados nos números anteriores deve apor-se, na parte inferior do modelo, uma legenda identificando a presente lei.

4 — O dístico referido no n.º 1 deve ainda conter o montante da coima máxima aplicável aos fumadores que violem a proibição de fumar.

5 — Nos casos previstos nos n.ºs 6, 7 e 8 do artigo anterior, os dísticos devem ser afixados de forma a serem visíveis a partir do exterior dos estabelecimentos.

## Artigo 7.º

### Responsabilidade

1 — O cumprimento do disposto nos artigos 4.º a 6.º deve ser assegurado pelas entidades públicas ou privadas que tenham a seu cargo os locais a que se refere a presente lei.

2 — Sempre que se verifiquem infracções ao disposto nos artigos 4.º a 6.º, as entidades referidas no número anterior devem determinar aos fumadores que se abstenham de fumar e, caso estes não cumpram, chamar as autoridades



administrativas ou policiais, as quais devem lavrar o respectivo auto de notícia.

3 — Todos os utentes dos locais referidos no n.º 1 têm o direito de exigir o cumprimento do disposto nos artigos 4.º a 6.º, podendo apresentar queixa por escrito, circunstanciada, usando para o efeito, nomeadamente, o livro de reclamações disponível no estabelecimento em causa.

### CAPÍTULO III

#### **Composição e medição das substâncias contidas nos cigarros comercializados**

##### **Artigo 8.º**

##### **Teores máximos de alcatrão, nicotina e monóxido de carbono dos cigarros**

Os cigarros comercializados ou fabricados em território nacional não podem ter teores superiores a:

- a) 10 mg por cigarro, para o alcatrão;
- b) 1 mg por cigarro, para a nicotina;
- c) 10 mg por cigarro, para o monóxido de carbono.

##### **Artigo 9.º**

##### **Métodos de medição**

1 — Os teores de alcatrão, nicotina e monóxido de carbono dos cigarros são medidos segundo as normas ISO 4387 para o alcatrão, ISO 10315 para a nicotina e ISO 8454 para o monóxido de carbono.

2 — A exactidão das menções relativas ao alcatrão e à nicotina apostas nos maços de cigarros é verificada segundo a norma ISO 8243.

3 — O disposto nos números anteriores deve ser efectuado ou verificado por laboratórios de ensaio acreditados pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), nos termos do n.º 1 do artigo 6.º do Decreto-Lei n.º 125/2004, de 31 de Maio, ou pelas autoridades competentes dos outros Estados membros.

4 — A lista dos laboratórios é comunicada pelo IPAC à Direcção-Geral da Saúde, dela constando os critérios utilizados para a acreditação de cada um.

5 — A Direcção-Geral da Saúde comunica à Comissão Europeia a lista dos laboratórios, nos termos do n.º 4, bem como as alterações que ocorram.

6 — Os cigarros são submetidos às medições pelo fabricante ou importador de produtos do tabaco, que é responsável pelos respectivos encargos.

7 — Sempre que a Direcção-Geral da Saúde o determine, os fabricantes ou importadores de produtos do tabaco devem realizar testes, a fim de avaliar o teor de outras substâncias produzidas pelos seus produtos do tabaco, por marca e tipo individuais, e os efeitos dessas substâncias sobre a saúde, tendo nomeadamente em conta o respectivo perigo de dependência.

8 — Os resultados dos testes efectuados nos termos deste artigo devem ser apresentados pelo fabricante ou importador de produtos do tabaco à Direcção-Geral da Saúde, até 30 de Setembro de cada ano.

9 — A Direcção-Geral da Saúde assegura a divulgação, por qualquer meio adequado, dos dados apresentados em conformidade com este artigo, a fim de informar os consumidores, tendo em conta, sempre que seja caso disso, as informações que constituam segredo de fabrico, a especificar pelo fabricante ou importador de produtos do tabaco.

10 — A Direcção-Geral da Saúde comunica à Comissão Europeia, até 31 de Dezembro de cada ano, todos os dados e informações decorrentes das medições previstas neste artigo.

##### **Artigo 10.º**

##### **Outras informações relativas ao produto**

1 — Os fabricantes ou importadores de produtos do tabaco devem apresentar à Direcção-Geral da Saúde, anualmente, até 30 de Setembro, em suporte informático, a lista de todos os ingredientes e respectivas quantidades utilizados no fabrico dos seus produtos do tabaco, por marca e tipo individuais.

2 — A lista referida no número anterior deve ser acompanhada de uma declaração que exponha as razões da inclusão desses ingredientes nos produtos do tabaco, com indicação da sua função e categoria, e de informação sobre os dados toxicológicos de que o fabricante ou importador disponha sobre esses ingredientes, com ou sem combustão, conforme for o caso, mencionando em especial os seus efeitos sobre a saúde, nomeadamente o risco de dependência, elaborada por ordem decrescente do peso de cada ingrediente incluído no produto.

3 — Os fabricantes ou importadores de produtos do tabaco devem especificar as informações que entendam não dever ser divulgadas, nos termos do número seguinte, por constituírem segredo de fabrico.

4 — A lista referida no n.º 1, com indicação dos teores de alcatrão, nicotina e monóxido de carbono, é divulgada pela Direcção-Geral da Saúde aos consumidores, com salvaguarda das informações relativas a fórmulas de produtos específicos que constituam segredo de fabrico.

5 — A Direcção-Geral da Saúde comunica anualmente à Comissão Europeia, até 31 de Dezembro, os dados e informações decorrentes das medições previstas neste artigo.

### CAPÍTULO IV

#### **Rotulagem e embalagem dos maços de cigarros**

##### **Artigo 11.º**

##### **Rotulagem**

1 — Os teores de alcatrão, nicotina e monóxido de carbono dos cigarros medidos em conformidade com o artigo 9.º devem ser impressos numa face lateral dos maços, em língua portuguesa, de forma a abrangerem pelo menos 10 % da superfície correspondente, ou, noutras embalagens de cigarros, de forma igualmente visível.

2 — Todas as unidades de embalagem dos produtos do tabaco devem apresentar as seguintes advertências:

a) Advertências gerais:

«Fumar mata»;

«Fumar prejudica gravemente a sua saúde e a dos que o rodeiam»;

b) Uma advertência complementar escolhida da lista constante do anexo II da presente lei e que dela faz parte integrante.

3 — Cada uma das advertências gerais e complementares deve aparecer regularmente, pelo que a sua aposição deve ser alternada.

4 — A advertência geral deve ser impressa na face mais visível das unidades de embalagem e as advertências complementares na outra face destas unidades, devendo estas advertências constar, obrigatoriamente, das unidades de embalagem e de qualquer embalagem exterior utilizada na venda a retalho do produto, excluindo as sobre embalagens transparentes.

5 — As advertências gerais previstas na alínea *a*) do n.º 2 devem cobrir pelo menos 30 % da área externa da superfície correspondente da unidade de embalagem do tabaco em que é impressa.

6 — A advertência complementar exigida na alínea *b*) do n.º 2 deve cobrir pelo menos 40 % da área externa da superfície correspondente da unidade de embalagem de tabaco em que é impressa.

7 — A superfície das advertências a que se refere o presente artigo, no caso das unidades de embalagens destinadas aos produtos que não os cigarros cuja face mais visível exceda 75 cm<sup>2</sup>, deve ser de, pelo menos, 22,5 cm<sup>2</sup> para cada face.

8 — O texto das advertências gerais, das advertências complementares e das indicações dos teores deve ser:

*a*) Impresso em língua portuguesa e em minúsculas, com excepção da primeira letra da mensagem e das exigências gramaticais;

*b*) Impresso em corpo negro «Helvética» sobre fundo branco, de modo a ocupar o maior espaço possível da superfície reservada para o texto em questão;

*c*) Centrado na área em que o texto deve ser impresso, paralelamente ao bordo superior da embalagem;

*d*) Rodeado de uma moldura negra com 4 mm de largura, que não interfira com o texto da advertência ou da informação prestada.

9 — No caso de produtos do tabaco que não os cigarros, as advertências mencionadas no presente artigo podem ser apostas por meio de autocolantes, desde que estes sejam inamovíveis.

10 — É proibida a impressão dos textos especificados neste artigo nos selos fiscais das unidades de embalagem e em local susceptível de ser danificado pela abertura dessas embalagens, devendo ser impresso de modo inamovível, indelével, não dissimulado, velado ou separado por outras indicações ou imagens.

11 — Para além das exigências previstas nos números anteriores, deve ainda constar em cada unidade de embalagem o respectivo número de lote ou equivalente, de modo a permitir identificar o local e o momento de produção.

#### Artigo 12.º

##### Embalagem

As unidades de embalagem de cigarros não podem ser comercializadas contendo menos de 20 unidades.

#### Artigo 13.º

##### Denominações do produto

Não podem ser utilizados em embalagens de produtos do tabaco textos, designações, marcas e símbolos figurativos ou outros sinais que sugiram que um determinado produto do tabaco é menos prejudicial do que os outros, com excepção do disposto no n.º 1 do artigo 11.º

#### Artigo 14.º

##### Tabacos destinados ao uso oral

É proibida a comercialização de tabacos destinados ao uso oral.

### CAPÍTULO V

#### Venda de produtos do tabaco

#### Artigo 15.º

##### Proibição de venda de produtos do tabaco

1 — É proibida a venda de produtos do tabaco:

*a*) Nos locais a que se referem as alíneas *a*), *d*), *e*), *f*), *g*), *h*) e *r*) do n.º 1 do artigo 4.º e nas instalações referidas na alínea *m*) do mesmo artigo;

*b*) Através de máquinas de venda automática, sempre que estas não reúnam cumulativamente os seguintes requisitos:

*i*) Estejam munidas de um dispositivo electrónico ou outro sistema bloqueador que impeça o seu acesso a menores de 18 anos;

*ii*) Estejam localizadas no interior do estabelecimento comercial, de forma a serem visualizadas pelo responsável do estabelecimento, não podendo ser colocadas nas respectivas zonas de acesso, escadas ou zonas similares e nos corredores de centros comerciais e grandes superfícies comerciais;

*c*) A menores com idade inferior a 18 anos, a comprovar, quando necessário, por qualquer documento identificativo com fotografia;

*d*) Através de meios de televisão.

2 — A proibição referida na alínea *c*) do número anterior deve constar de aviso impresso em caracteres facilmente legíveis, sobre fundo contrastante, e afixado de forma visível nos locais de venda dos produtos do tabaco.

3 — É proibida a comercialização de embalagens promocionais ou a preço reduzido.

4 — Por portaria conjunta dos Ministros das Finanças e da Saúde, poderá ser proibida a venda de produtos do tabaco a preço inferior a um preço mínimo de referência.

### CAPÍTULO VI

#### Publicidade, promoção e patrocínio de tabaco e de produtos do tabaco

#### Artigo 16.º

##### Publicidade e promoção

1 — São proibidas todas as formas de publicidade e promoção ao tabaco e aos produtos do tabaco, incluindo a publicidade oculta, dissimulada e subliminar, através de suportes publicitários nacionais ou com sede em Portugal, incluindo os serviços da sociedade de informação, salvo o disposto nos n.ºs 3, 4 e 7.

2 — É proibida a publicidade ao tabaco, ou ao seu uso, em máquinas de venda automática.

3 — O disposto no n.º 1 não é aplicável à informação comercial circunscrita às indicações de preço, marca e origem exibida exclusivamente no interior dos estabelecimentos que vendam produtos do tabaco, desde que

esta não seja visível no exterior dos estabelecimentos, designadamente nas respectivas montras.

4 — A publicidade na imprensa e noutros meios de comunicação impressos só é permitida em publicações destinadas exclusivamente aos profissionais do comércio do tabaco ou em publicações impressas e editadas em países terceiros, desde que não se destinem principalmente ao mercado comunitário.

5 — É proibida a distribuição gratuita ou a venda promocional de produtos do tabaco ou de quaisquer bens de consumo, que visem, ou tenham por efeito directo ou indirecto, a promoção desses produtos do tabaco.

6 — É proibida a distribuição de brindes, atribuição de prémios ou a realização de concursos, ainda que exclusivamente destinados a fumadores, por parte de empresas directa ou indirectamente relacionadas com o fabrico, a distribuição ou a venda de produtos do tabaco.

7 — É apenas admitida a promoção de produtos do tabaco quando esta se destine exclusivamente aos profissionais do comércio do tabaco e seja realizada fora do âmbito da actividade de venda ao público.

8 — É proibida a introdução de copões ou outros elementos estranhos nas embalagens e sobre embalagens de produtos do tabaco, ou entre estas e aquelas, para além do próprio produto do tabaco e respectiva rotulagem.

9 — É proibida a promoção de vendas e a introdução no consumo de embalagens miniatura de marcas já comercializadas ou a comercializar.

#### Artigo 17.º

##### Publicidade em objectos de consumo

1 — Em acções publicitárias, é proibido colocar nomes, marcas ou emblemas de um produto do tabaco em objectos de consumo que não os próprios produtos do tabaco.

2 — Exceptuam-se da proibição prevista no número anterior os bens e serviços que façam uso de nomes ou marcas idênticos aos de produtos do tabaco, desde que preenchidos os seguintes requisitos:

a) A sua venda ou patrocínio não estejam relacionados com a venda de produtos do tabaco;

b) Tais bens ou serviços tenham sido introduzidos no mercado português previamente à data de publicação da presente lei;

c) O método de uso de tais nomes e marcas seja claramente distinto dos nomes e marcas de produtos do tabaco.

3 — É proibido o fabrico e a comercialização de jogos, brinquedos, jogos de vídeo, alimentos ou guloseimas com a forma de produtos do tabaco, ou com logótipos de marcas de tabaco.

#### Artigo 18.º

##### Patrocínio

1 — É proibida qualquer forma de contributo público ou privado, nomeadamente por parte de empresas cuja actividade seja o fabrico, a distribuição ou a venda de produtos do tabaco, destinado a um evento, uma actividade, um indivíduo, uma obra áudio-visual, um programa radiofónico ou televisivo, que vise, ou tenha por efeito directo ou indirecto, a promoção de um produto do tabaco ou do seu consumo.

2 — É proibido o patrocínio de eventos ou actividades por empresas do sector do tabaco que envolvam ou se realizem em vários Estados membros ou que tenham quaisquer outros efeitos transfronteiriços.

3 — É proibida a distribuição gratuita ou a preços promocionais de produtos do tabaco, no contexto do patrocínio referido no número anterior, que vise ou tenha por efeito directo ou indirecto a promoção desses produtos.

## CAPÍTULO VII

### Medidas de prevenção e controlo do tabagismo

#### Artigo 19.º

##### Campanhas de informação, de prevenção ou de promoção de vendas

São proibidas campanhas ou outras iniciativas promovidas ou patrocinadas pelas empresas produtoras, distribuidoras, subsidiárias ou afins, de produtos do tabaco, que visem, directa ou indirectamente, a informação e a prevenção do tabagismo.

#### Artigo 20.º

##### Informação e educação para a saúde

1 — O Estado, designadamente os sectores da saúde, da educação, da juventude, do desporto, da defesa do consumidor, do ambiente, do trabalho, da economia e da cultura, bem como as regiões autónomas e as autarquias locais, devem promover a informação dos cidadãos, utilizando, sempre que possível, a língua gestual e a linguagem *Braille*, e contribuir para a criação de condições favoráveis à prevenção e ao controlo do tabagismo.

2 — Os serviços de saúde, independentemente da sua natureza jurídica, designadamente centros de saúde, hospitais, clínicas, consultórios médicos e farmácias, devem promover e apoiar a informação e a educação para a saúde dos cidadãos relativamente aos malefícios decorrentes do consumo de tabaco e à importância da cessação tabágica, através de campanhas, programas e iniciativas destinadas à população em geral ou a grupos específicos, designadamente crianças e jovens, grávidas, pais, mulheres em idade fértil, pessoas doentes, professores e outros trabalhadores.

3 — A temática da prevenção e do controlo do tabagismo deve ser abordada no âmbito da educação para a cidadania, a nível dos ensinos básico e secundário e dos *curricula* da formação profissional, bem como da formação pré e pós-graduada dos professores destes níveis de ensino.

4 — A temática da prevenção e do tratamento do uso e da dependência do tabaco deve fazer parte dos *curricula* da formação pré e pós-graduada dos profissionais de saúde, em particular dos médicos, dos médicos dentistas, dos farmacêuticos e dos enfermeiros, enquanto agentes privilegiados de educação e promoção da saúde.

#### Artigo 21.º

##### Consultas de cessação tabágica

1 — Devem ser criadas consultas especializadas de apoio aos fumadores que pretendam deixar de fumar, destinadas aos funcionários e aos utentes, em todos os centros de saúde integrados no Serviço Nacional de Saúde e nos serviços hospitalares públicos, em particular nos serviços de cardiologia, pneumologia, psiquiatria, nos institutos e serviços de oncologia, serviços de obstetrícia, hospitais psiquiátricos e centros de atendimento a alcoólicos e toxicodependentes.

2 — Sempre que a dimensão dos serviços e da população atendida não justifique a criação de uma consulta espe-

cializada, devem ser estabelecidos protocolos com outras consultas especializadas, de modo a garantir o acesso adequado dos fumadores que necessitem deste tipo de apoio para deixarem de fumar.

## Artigo 22.º

### Grupo técnico consultivo

1 — É criado, na dependência directa do director-geral da Saúde, um grupo técnico consultivo, visando prestar assessoria técnica, bem como prestar colaboração na definição e implementação de programas e outras iniciativas no domínio da prevenção e controlo do tabagismo.

2 — O grupo técnico consultivo, designado por despacho do director-geral da Saúde, é constituído, paritariamente, por representantes da Administração Pública e da sociedade civil, e, quanto a esta, nomeadamente de ordens profissionais da área da saúde, de associações sindicais e patronais, de sociedades científicas, por personalidades de reconhecido mérito no domínio da prevenção do tabagismo e ainda por representantes de outras organizações não governamentais.

## Artigo 23.º

### Dever de colaboração

A Direcção-Geral da Saúde promove o cumprimento do disposto na presente lei, com a colaboração dos serviços e organismos públicos com responsabilidades nesta área.

## Artigo 24.º

### Estudo estatístico

1 — A Direcção-Geral da Saúde, em articulação com o Observatório Nacional de Saúde e com o grupo técnico consultivo, assegura o acompanhamento estatístico e epidemiológico do consumo de tabaco em Portugal, bem como o impacte resultante da aplicação da presente lei, designadamente quanto ao seu cumprimento, à evolução das condições nos locais de trabalho e de atendimento ao público, a fim de permitir propor as alterações adequadas à prevenção e controlo do consumo do tabaco.

2 — Com o objectivo de avaliar o impacte da presente lei na saúde pública e na saúde dos trabalhadores, o Ministério da Saúde deve habilitar a Assembleia da República com um relatório contendo os elementos referidos no número anterior, de cinco em cinco anos.

3 — O primeiro relatório deve ser entregue na Assembleia da República decorridos três anos sobre a entrada em vigor da lei.

## CAPÍTULO VIII

### Regime sancionatório

## Artigo 25.º

### Contra-ordenações

1 — Constituem contra-ordenações as infracções ao disposto nos artigos 4.º a 6.º, no n.º 2 do artigo 7.º e nos artigos 8.º a 19.º, as quais são punidas com as seguintes coimas:

a) De € 50 a € 750, para o fumador que fume nos locais previstos nas alíneas a) a bb) do n.º 1 e no n.º 2 do artigo 4.º ou fora das áreas ao ar livre ou das áreas para fumadores previstas nos n.ºs 1 a 9 do artigo 5.º;

b) De € 50 a € 1000, para os proprietários dos estabelecimentos privados, pessoas colectivas, sociedades ainda que irregularmente constituídas, ou associações sem personalidade jurídica, bem como para os órgãos directivos ou dirigentes máximos dos organismos, estabelecimentos ou serviços da Administração Pública que violem o disposto no n.º 2 do artigo 7.º;

c) De € 2500 a € 10 000, para entidades referidas na alínea anterior que violem o disposto nos n.ºs 1 a 9 do artigo 5.º e no artigo 6.º;

d) De € 10 000 a € 30 000, para as infracções aos n.ºs 6, 7 e 8 do artigo 9.º e aos n.ºs 1 e 2 do artigo 10.º, sendo o valor reduzido para € 1500 e € 3000, respectivamente, se o infractor for pessoa singular;

e) De € 30 000 a € 250 000, para as infracções ao artigo 8.º, ao n.º 3 do artigo 9.º e aos artigos 11.º, 12.º, 13.º, 14.º, 15.º, 16.º, 17.º, 18.º e 19.º, sendo o valor reduzido para € 2000 e € 3750, respectivamente, se o infractor for pessoa singular.

2 — A negligência é punível, sendo os limites mínimos e máximos das coimas aplicáveis reduzidos a metade.

3 — Nos casos previstos na alínea e) do n.º 1, a tentativa é punível, sendo os limites mínimos e máximos das coimas aplicáveis reduzidos a metade.

4 — Quando a infracção implicar forma de publicidade oculta ou dissimulada, é aplicável a punição prevista nas normas gerais sobre a actividade publicitária.

5 — As contra-ordenações previstas na presente lei e em tudo quanto nela se não encontre especialmente regulado são aplicáveis as disposições do Decreto-Lei n.º 433/82, de 27 de Outubro, com as alterações introduzidas pelos Decretos-Leis n.ºs 356/89, de 17 de Outubro, 244/95, de 14 de Setembro, e 323/2001, de 17 de Dezembro, e pela Lei n.º 109/2001, de 24 de Dezembro.

## Artigo 26.º

### Sanções acessórias

1 — No caso das contra-ordenações previstas nas alíneas c), d) e e) do n.º 1 do artigo anterior, podem ainda ser aplicadas as sanções acessórias previstas nas alíneas a) a g) do n.º 1 do artigo 21.º do Decreto-Lei n.º 433/82, de 27 de Outubro, na redacção que lhe foi dada pelos Decretos-Leis n.ºs 356/89, de 17 de Outubro, e 244/95, de 14 de Setembro.

2 — O incumprimento do disposto nos n.ºs 1 a 3 do artigo 15.º determina a aplicação da sanção acessória de interdição de venda de qualquer produto do tabaco.

## Artigo 27.º

### Responsabilidade solidária

1 — Pelo pagamento das coimas em que sejam condenados os agentes das infracções ao disposto nos n.ºs 6, 7 e 8 do artigo 9.º, nos n.ºs 1 e 2 do artigo 10.º, no artigo 11.º e no artigo 13.º são solidariamente responsáveis o fabricante e o importador de produtos do tabaco.

2 — Pelo pagamento das coimas em que sejam condenados os agentes das infracções ao disposto na alínea b) do n.º 1 do artigo 15.º e no n.º 2 do artigo 16.º são solidariamente responsáveis o proprietário da máquina de venda automática de tabaco e aquele que tenha a direcção efectiva do espaço em que o equipamento se encontra instalado.

3 — Pelo pagamento das coimas em que sejam condenados os agentes das infracções ao disposto no artigo 17.º são solidariamente responsáveis o fabricante ou importador e o proprietário dos locais onde estes produtos sejam disponibilizados, de forma onerosa ou gratuita.

4 — Pelo pagamento das coimas em que sejam condenados os agentes das infracções ao disposto na alínea d) do n.º 1 do artigo 15.º, nos n.ºs 1, 6 e 8 do artigo 16.º e no n.º 1 do artigo 19.º são solidariamente responsáveis o promotor da venda ou da campanha, a agência de publicidade e as entidades proprietárias do suporte publicitário utilizado.

5 — Pelo pagamento das coimas em que sejam condenados os agentes das infracções ao disposto nos n.ºs 1 e 2 do artigo 18.º são solidariamente responsáveis a entidade patrocinadora e a entidade patrocinada.

6 — As entidades proprietárias do suporte publicitário utilizado, o comerciante ou o promotor da venda eximem-se da responsabilidade referida no n.º 4 caso demonstrem não ter tido prévio conhecimento da mensagem publicitária difundida.

#### Artigo 28.º

##### Fiscalização e tramitação processual

1 — Sem prejuízo das competências atribuídas pelo artigo 7.º às autoridades administrativas e policiais, a fiscalização do disposto na presente lei compete à Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, à excepção da fiscalização do preceituado na alínea d) do n.º 1 do artigo 15.º, no n.º 1 do artigo 16.º, no n.º 1 do artigo 18.º e no artigo 19.º, que compete à Direcção-Geral do Consumidor.

2 — A instrução dos processos de contra-ordenação compete à Autoridade de Segurança Alimentar e Económica ou à Direcção-Geral do Consumidor, no âmbito das respectivas atribuições, e a quem devem ser enviados os autos levantados por outras entidades.

3 — A aplicação das coimas e sanções acessórias compete à Comissão de Aplicação de Coimas em Matéria Económica e de Publicidade, que delas dá conhecimento à Direcção-Geral da Saúde.

4 — O produto das coimas é distribuído da seguinte forma:

- a) 60 % para o Estado;
- b) 30 % para a entidade que instruiu o processo;
- c) 10 % para a Comissão de Aplicação de Coimas em Matéria Económica e de Publicidade.

## CAPÍTULO IX

### Disposições transitórias e finais

#### Artigo 29.º

##### Regiões Autónomas

1 — As Regiões Autónomas exercem as competências previstas na presente lei através dos organismos definidos pelos órgãos de governo próprio.

2 — O produto das coimas aplicadas nas Regiões Autónomas constitui receita própria destas.

#### Artigo 30.º

##### Norma revogatória

São revogados:

- a) A Lei n.º 22/82, de 17 de Agosto;
- b) O Decreto-Lei n.º 226/83, de 27 de Maio;

- c) O Decreto-Lei n.º 393/88, de 8 de Novembro;
- d) O Decreto-Lei n.º 287/89, de 30 de Agosto;
- e) O Decreto-Lei n.º 253/90, de 4 de Agosto;
- f) O artigo 18.º e o n.º 2 do artigo 24.º do Código da Publicidade, aprovado pelo Decreto-Lei n.º 330/90, de 23 de Outubro;
- g) O Decreto-Lei n.º 200/91, de 29 de Maio;
- h) O Decreto-Lei n.º 276/92, de 12 de Dezembro;
- i) O Decreto-Lei n.º 283/98, de 17 de Setembro;
- j) O artigo 95.º do Código dos Impostos Especiais de Consumo, aprovado pelo Decreto-Lei n.º 566/99, de 22 de Dezembro;
- l) O Decreto-Lei n.º 25/2003, de 4 de Fevereiro;
- m) O Decreto-Lei n.º 138/2003, de 28 de Junho;
- n) O Decreto-Lei n.º 76/2005, de 4 de Abril;
- o) O Decreto-Lei n.º 14/2006, de 20 de Janeiro;
- p) Os n.ºs 2 a 5 da Resolução do Conselho de Ministros n.º 35/84, de 11 de Junho;
- q) A Portaria n.º 165/84, de 26 de Março;
- r) A Portaria n.º 432/91, de 24 de Maio;
- s) A Portaria n.º 735/93, de 13 de Agosto;
- t) O despacho n.º 19/MS/88, de 25 de Janeiro de 1989;
- u) O despacho n.º 8/ME/88, de 8 de Fevereiro de 1989.

#### Artigo 31.º

##### Entrada em vigor

A presente lei entra em vigor no dia 1 de Janeiro de 2008.

Aprovada em 28 de Junho de 2007.

O Presidente da Assembleia da República, *Jaime Gama*.

Promulgada em 26 de Julho de 2007.

Publique-se.

O Presidente da República, ANÍBAL CAVACO SILVA.

Referendada em 2 de Agosto de 2007.

Pelo Primeiro-Ministro, *Luís Filipe Marques Amado*,  
Ministro de Estado e dos Negócios Estrangeiros.

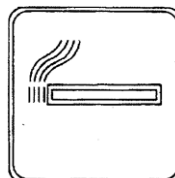
#### ANEXO I

##### MODELO A



**NÃO FUMADORES**  
**NO SMOKERS**  
**NON FUMEURS**

##### MODELO B



**FUMADORES**  
**SMOKERS**  
**FUMEURS**

## ANEXO II

**Lista das advertências complementares**

- a) «Os fumadores morrem prematuramente».
- b) «Fumar bloqueia as artérias e provoca ataques cardíacos e enfartes».
- c) «Fumar provoca o cancro pulmonar mortal».
- d) «Se está grávida: fumar prejudica a saúde do seu filho».
- e) «Proteja as crianças: não as obrigue a respirar o seu fumo».
- f) «O seu médico ou o seu farmacêutico podem ajudá-lo a deixar de fumar».
- g) «Fumar causa elevada dependência. Não comece a fumar».
- h) «Deixar de fumar reduz os riscos de doenças cardiovasculares e pulmonares mortais».
- i) «Fumar pode provocar uma morte lenta e dolorosa».
- j) «Para o ajudar a deixar de fumar, consulte o seu médico ou contacte o seu farmacêutico».
- l) «Fumar pode reduzir o fluxo de sangue e provoca impotência».
- m) «Fumar provoca o envelhecimento da pele».
- n) «Fumar pode prejudicar o esperma e reduz a fertilidade».
- o) «O fumo contém benzeno, nitrosaminas, formaldeído e cianeto de hidrogénio».

**PRESIDÊNCIA DO CONSELHO DE MINISTROS****Resolução do Conselho de Ministros n.º 106/2007**

O artigo 48.º do Decreto-Lei n.º 102/2001, de 29 de Março, criou transitoriamente, pelo período de três anos, uma equipa de projecto tendo em vista o desenvolvimento de projectos e aplicações informáticas, bem como o apoio à utilização da informática e das novas tecnologias de informação nos tribunais.

Esta estrutura foi objecto de avaliação e em virtude dos bons resultados verificados o Governo, através do Decreto-Lei n.º 128/2004, de 1 de Junho, prorrogou o seu prazo de funcionamento até 30 de Março de 2007. O Decreto-Lei n.º 124/2007, de 27 de Abril, que revogou o Decreto-Lei n.º 102/2001 e que aprovou a nova Lei Orgânica da Direcção-Geral da Administração da Justiça, exceptuou no artigo 10.º a extinção da equipa de projecto de apoio à informatização dos tribunais, mantendo a sua estrutura, a sua composição e a remuneração dos membros da equipa de projecto.

É neste quadro que as tarefas dos elementos da equipa de projectos formada essencialmente por funcionários judiciais vêm contribuindo de forma decisiva para a informatização dos tribunais através da criação e desenvolvimento de aplicações informáticas e do apoio aos seus utilizadores.

É a estrutura responsável pelo desenvolvimento de aplicações informáticas como a aplicação de gestão processual *Habilus* que garante o registo e a tramitação da totalidade dos processos que correm termos em todos os tribunais judiciais, a aplicação de gestão orçamental dos tribunais e a aplicação de gestão de injunções.

Igualmente, é a estrutura responsável pelo apoio a mais de 11 000 utilizadores, entre magistrados e funcionários, e o funcionamento de mais de 50 000 equipamentos de informática.

Consequentemente, sob pena de se verificarem graves constrangimentos no desenvolvimento da informatização dos tribunais, entende o Governo que um dos factores decisivos para o sucesso assinalável destes projectos consistiu no facto de a sua estrutura ter um núcleo constituído por profissionais dedicados em exclusivo à sua concretização.

Assim:

Nos termos da alínea g) do artigo 199.º da Constituição, o Conselho de Ministros resolve:

1 — Prorrogar por um ano, com efeitos a partir de 30 de Março de 2007, o prazo de funcionamento da equipa de projecto criada pelo n.º 1 do artigo 48.º do Decreto-Lei n.º 102/2001, de 29 de Março.

2 — Determinar que a presente resolução entra em vigor no dia seguinte ao da sua publicação.

Presidência do Conselho de Ministros, 19 de Julho de 2007. — Pelo Primeiro-Ministro, *Luís Filipe Marques Amado*, Ministro de Estado e dos Negócios Estrangeiros.

## **MINISTÉRIOS DO AMBIENTE, DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO E DO DESENVOLVIMENTO REGIONAL E DA AGRICULTURA, DO DESENVOLVIMENTO RURAL E DAS PISCAS**

**Portaria n.º 903/2007**

**de 14 de Agosto**

Pela Portaria n.º 382-F/2002, de 9 de Abril, foi renovada à Associação de Caça e Pesca do Coroto a zona de caça associativa de Rabal (processo n.º 1838-DGRF), situada no município de Bragança, válida até 16 de Julho de 2007.

Entretanto, a entidade concessionária veio requerer a sua renovação, tendo em simultâneo solicitado a correcção da área primitivamente concessionada de 1540 ha para 1524 ha, por exclusão das áreas sociais (terrenos não cinegéticos) e alteração das freguesias pela nova divisão administrativa das mesmas.

Cumpridos os preceitos legais, com fundamento no disposto no artigo 48.º, em conjugação com o estipulado na alínea a) do artigo 40.º e no n.º 1 do artigo 118.º, do Decreto-Lei n.º 202/2004, de 18 de Agosto, com as alterações introduzidas pelo Decreto-Lei n.º 201/2005, de 24 de Novembro, manda o Governo, pelos Ministros do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional e da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, o seguinte:

1.º Pela presente portaria é renovada, por um período de seis anos, a concessão da zona de caça associativa de Rabal (processo n.º 1838-DGRF), conforme planta anexa à presente portaria e que dela faz parte integrante, abrangendo vários prédios rústicos sitos nas freguesias de Rabal, França e Aveleda, município de Bragança, com a área de 1524 ha.

## LISTA DE ALGUNS CONSTITUINTES DO FAT

g-Butyrolactone	2,4-Xylenol	5,6-
b-Carboline	2,5-Dimethylaniline	Cyclopentenobenzanthracene
b-Carotene	2,5-Dimethylphenanthrene	5-Methylchrysene
a-Ketoglutaric acid	2,5-Lutidine	6,7-
b-Methylvaleric acid	2,6-Dimethylaniline	Cyclopentenobenzanthracene
b-Phenethyl alcohol	2,6-Dimethylpyridine	7,8-Benzofluoranthene
g-Sitosterol	2,6-Lutidine	7H-Dibenzo[c,g]carbazole
b-Sitosterol	2',3'-Naphtho-3,4-pyrene	8,9-Benzofluoranthene
a-Socratine	2-Aminobiphenyl	8-Methylfluorene
b-Socratine	2-Ethylaniline	9,10-Dimethyl-1,2-
g-Socratine	2-Methyl-1-naphthylamine	benzanthracene
1,12-Benzoperylene	2-Methylanthracene	9-Methyl-1,2-benzofluorene
1,1-Dimethylhydrazine	2-Methylfuran	9-Methylfluorene
1,2,4-Trimethylbenzene	2-Methylnaphthalene	9-Methylphenanthrene
1,2-3,4-5,6-Tribenzanthracene	2-Methylpyridine	A fluorene carboxylic acid
1,2-3,4-Dibenzopyrene	2-Naphthol	AaC
1,2-5,6-Dibenzanthracene	2-Naphthylamine	Acenaphthene
1,2-7,8-Dibenzofluorene	2-Nitropropane	Acenaphthylene
1,2-7,8-Dibenzonaphthalene	2-Picoline	Acetaldehyde
1,2-Benzanthracene	2-Toludine	Acetamide
1,2-Benzofluorene	2-Vinylphenol	Acetic acid
1,2-Benzonaphthalene	3,4-8,9-Dibenzopyrene	Acetone
1,2-Benzopyrene	3,4-9,10-Dibenzopyrene	Acetylene
1,3,5-Trimethylbenzene	3,4-Benzofluoranthene	Acridine
1,3,5-Trimethylbenzene	3,4-Benzopyrene	Acrolein
1,3,5-Trimethylbenzene	3,4-Dihydro-3,4-benzopyrene	Acrylamide
1,3-Butadiene	3,5-Xylenol	Acrylonitrile
1,3-Dimethoxy pyrogallol	3-Aminobiphenyl	Adipic acid
1,8,9-Perinaphthoxanthene	3-Ethenylpyridine	Aluminum
1,8-Dimethylnaphthalene	3-Ethylaniline	Ammonia
1,8-p-Menthadiene	3-Hydroxyisoeugenol	Anabasine
11,12-Benzofluoranthene	3-Methylpyridine	Anatabine
1-Aminonaphthalene	3-Methyl-1,2-benzanthracene	Aniline
1-Azafluoranthene	3-Methylcatechol	Anodmine
1-Azapyrene	3-Methylpyrene	Anthanthrene
1-Methylchrysene	3-Methylpyridine	Anthracene
1-Methylnaphthalene	3-Picoline	Anthraceno-2,3-9,10-
1-Methylpyrene	3-Pyridyl ethyl ketone	phenanthrene
1-Naphthol	3-Pyridyl methyl ketone	Arachidic acid
1-Naphthylamine	3-Pyridyl propyl ketone	Argon
2-Aminonaphthalene	3-Vinylphenol	Arsenic
2,1-Naphtho-1,2-fluorene	3-Vinylpyridine	Azulene
2,3'-Bipyridyl	4-Aminobiphenyl	Benz[a]acridine
2,3-Benzofluorene	4-Azafluorene	Benz[c]acridine
2,3-Butanedione	4-Ethylcatechol	Benz[f]indene
2,3-Dimethylaniline	4-Methylcatechol	Benzaldehyde
2,3-Dimethylmaleic anhydride	4-Methylpyrene	Benzene
2,3-Dimethylpyrazine	4-Picoline	Benzimidazole
2,3-Pentanedione	4-Vinylcatechol	Benzo[a]pyrene
2,4-Dimethylaniline	4-Vinylguaiacol	Benzo[a]anthracene
2,4-Lutidine	4-Vinylpheno	Benzo[b]fluoranthene

Benzo[b]fluorene	Dibenz[a,j]acridine	Glutamine
Benzo[b]furan	Dibenz[a,c]anthracene	Glutaric acid
Benzo[c]fluorene	Dibenz[a,h]acridine	Glycerol
Benzo[c]phenanthrene	Dibenz[a,h]anthracene	Glycolic acid
Benzo[e]pyrene	Dibenz[a,j]acridine	Guaiacol (2-Methoxyphenol)
Benzo[f]quinoline	Dibenzo[a,e]fluoranthene	Gudham
Benzo[ghi]perylene	Dibenzo[a,e]pyrene	Harman (1-methyl-bcarboline)
Benzo[h]quinoline	Dibenzo[a,h]pyrene	Heptylic acid
Benzo[j]fluoranthene	Dibenzo[a,i]pyrene	Hydrazine
Benzo[k]fluoranthene	Dibenzo[a,l]pyrene	Hydrogen cyanide
Benzo[m,n,o]fluoranthene	Dibenzo[b,d]furan	Hydrogen sulfide
Benzoic acid	Dibenzo[c,g]carbazole	Hydrogen thiocyanide
Benzophenanthrene	Diethyl ketone	Hydroquinone
Benzyl alcohol	Diethylene glycol	Indeno[1,2,3-cd]pyrene
Beryllium	Dimethylamine	Indole
Butane	Dimethylchrysene	Ionene
Butylbenzene	Dimethylfluoranthene	IQ
Butyraldehyde	Dimeyhtlamine	Iron
Butyric acid	Dipentene	Isobutane
C25-C33 paraffins	Dipropyl ketone	Isobutylene
Cadmium	Ergosterol	Isobutyraldehyde
Caffeic acid	Esculetin	Isobutyric acid
Calcium	Ethane	Isoeugenol
Campesterol	Ethanol	Isoprene
Caproic acid	Ethyl b-methylvalerate	Isopropylbenzene
Caprylic acid	Ethyl acetate	Isoquinoline
Captan	Ethyl carbamate	Isosqualene
Carbazole	Ethyl isovalerate	Lactic acid
Carbon dioxide	Ethyl n-butyrate	Lathrein
Carbon monoxide	Ethyl n-caproate	Lauric acid
Carbon oxysulfide	Ethyl propionate	Lead
Carbonyl sulfide	Ethylamine	Levantenolide
Catechol	Ethylbenzene	Levulinic acid
Cerotic acid	Ethylene	Limonene
Chlorinated dioxins and furans	Ethylene glycol	Linoleic acid
Chlorogenic acid (3-o-caffeoyld-quinic acid)	Ethylene oxide	Linolenic acid
Cholesterol	Ethylphenols	Lohitam
Chromium VI	Eugenol	Lutidine
Chrysene	Ferulic acid	Magnesium
Cichoriin	Fluoranthene	Maleic anhydride
Cobalt	Fluoranthene	Maleic hydrazide
Collidine	Fluorene	Malic acid
Copper	Formaldehyde	Malonic acid
Coronene	Formic acid	Manganese
Cotinine	Furan	m-Cresol
Coumarin	Furfural	Mercury
Crotonaldehyde	Furoic acid	Mesitol
Cyanogen	Glu-P-1	Methane
Cycloartenol	Glu-P-2	Methanol
Dibenz[a,j]anthracene	Glutamic acid	Methyl acetate



Methyl chloride	4-(N-methyl-N- nitrosamino)-	Pyrene
Methyl ethyl ketone	1-(3-pyridyl)-1-butanone	Pyridine
Methyl formate	Nonylic acid	Pyridine-3-aldehyde
Methyl nitrate	Nornicotine	Pyrrole
Methylacetylene	Nornicotyrine	Pyrrolidine
Methylamine	Norphytene	Pyrrolo[2,3-b]pyridine
Methyleugenol	o-Anisidine	Pyruvic acid
Methylglyoxal	Obeline	Quinoline
m-Hydroxyacetophenone	o-Cresol	Quinoxaline
m-Toluidine	Oleic acid	Reductic acid
Myosmine	Oleic acid	Resin acid
Myristic acid	o-Toluidine	Resorcinol
N'-Nitrosoanabasine	Oxalic acid	Scopoletin
N'-Nitrosoanatabine	Palmitic acid	Scopoletin-b-gentiobioside
N'-Nitrosornicotine	Palmitoleic acid	Scopolin
Naphthalene	Palmitone	Sitosterol
Naphtho[2,3-b]pyrene	p-Cresol	Skatole
Neophytadiene	Perylene	Sodium
n-Hentriacontane	Phenanthrene	Solanesenes
Nickel	Phenanthridine	Solanesol
Nicotinamide	Phenol	Solanone
Nicotine	Phenylacetylene	Squalene
Nicotine-N'-oxid	PhIP	Stearic acid
Nicotinic acid	Phthalic acid	Stigmasterol
Nicotrine	P-Hydroxyacetophenone	Strontium
Nicotyrine	Phytadienes	Styrene
Nitrobenzene	Phytol	Succinic acid
Nitrogen oxides	Phytone	Succinic anhydride
Nitromethane	Picoline	Thiocyanogen
N-Methylmyosmine	Plastoquinone	Titanium
N-Methylpyrrolidine	Poikiline	Toluene
N-Nitrosodiethanolamine	Polonium-210	Triethylene glycol
N-Nitrosodiethylamine	Potassium	Trimethylamine
N-Nitrosodimethylamine	Propane	Triphenylene
N-Nitroso-di-n-butylamine	Propionaldehyde	Trp-P-1
N-Nitrosodi-n-propylamine	Propionic acid	Trp-P-2
N-Nitrosoethylmethylamine	Propylbenzene	Urethane
N-Nitroso-n-methylethylamine	Propylene	Veleric acid
N-Nitrosopiperidine	Propylene oxide	Vinyl chloride
N-Nitrosopyrrolidine	p-Toluidine	Xylenes
NNK	Pyndine	Xylenols
		Zinc

**DISTRIBUTION OF CONSTITUENTS IN FRESH, UNDILUTED  
MAINSTREAM SMOKE (MS) AND DILUTED SIDESTREAM  
SMOKE (SS) FROM NONFILTERED CIGARETTES**

<b>Constituintes</b>	<b>Quantidade do MS por cigarro</b>	<b>SS/MS ratio</b>
Carbon monoxide	12 - 23 mg	2.5 - 4.7
Carbon dioxide	20 - 40 mg	8 - 11
Carbonyl sulfide	18 - 42 <sub>g</sub>	0.03 - 0.13
Benzene	12 - 48 <sub>g</sub>	5 - 10
Toluene	100 - 200 <sub>g</sub>	5.6 - 8.3
Formaldehyde	70 - 100 <sub>g</sub>	0.1 - ~50
Acrolein	60 - 100 <sub>g</sub>	8 - 15
Acetone	100 - 250 <sub>g</sub>	2 - 5
Pyridine	16 - 40 <sub>g</sub>	6.5 - 20
3-Methylpyridine	12 - 36 <sub>g</sub>	3 - 13
3-Vinylpyridine	11 - 30 <sub>g</sub>	20 - 40
Hydrogen cyanide	400 - 500 <sub>g</sub>	0.1 - 0.25
Hydrazine	32 ng	3
Ammonia	50 - 130 <sub>g</sub>	40 - 170
Methylamine	11.5 - 28.7 <sub>g</sub>	4.2 - 6.4
Dimethylamine	7.8 - 10 <sub>g</sub>	3.7 - 5.1
Nitrogen oxides	100 - 600 <sub>g</sub>	4 - 10
N-Nitrosodimethylamine	10 - 40 ng	20 - 100
N-Nitrosodiethylamine ND	- 25 ng	< 40
N-Nitrosopyrrolidine	6 - 30 ng	6 - 30
Formic acid	210 - 490 <sub>g</sub>	1.4 - 1.6
Acetic acid	330 - 810 <sub>g</sub>	1.9 - 3.6
Methyl chloride	150 - 600 <sub>g</sub>	1.7 - 3.3
Particulate matter	15 - 40 mg	1.3 - 1.9
Nicotine	1 - 2.5 mg	2.6 - 3.3
Anatabine	2 - 20 <sub>g</sub>	< 0.1 - 0.5
Phenol	60 - 140 <sub>g</sub>	1.6 - 3.0
Catechol	100 - 360 <sub>g</sub>	0.6 - 0.9
Hydroquinone	110 - 300 <sub>g</sub>	0.7 - 0.9
Aniline	360 ng	30
2-Toluidine	160 ng	19
2-Naphthylamine	1.7 ng	30
4-Aminobiphenyl	4.6 ng	31
Benz[a]anthracene	20 - 70 ng	2 - 4
Benzo[a]pyrene	20 - 40 ng	2.5 - 3.5
Cholesterol	22 <sub>g</sub>	0.9
Butyrolactone	10 - 22 <sub>g</sub>	3.6 - 5.0
Quinoline	0.5 - 2 <sub>g</sub>	8 - 11
Harman	1.7 - 3.1 <sub>g</sub>	0.7 - 1.7
N'-Nitrosomonicotine	200 - 3000 ng	0.5 - 3
NNK	100 - 1000 ng	1 - 4
N-Nitrosodiethanolamine	20 - 70 ng	1.2

Cadmium	100 ng	7.2
Nickel	20 - 80 ng	13 - 30
Zinc	60 ng	6.7
Polonium-210	0.04 - 0.1 pCi	.0 - 4.0
Benzoic acid	14 - 28 $\mu$ g	0.67 - 0.95
Lactic acid	63 - 174 $\mu$ g	0.5 - 0.7
Glycolic acid	37 - 126 $\mu$ g	0.6 - 0.95
Succinic acid	110 - 140 $\mu$ g	0.43 - 0.62

Source: (NRC, 1986 citado CEPA: Air Resources Board, 2005)

MS: Mainstream Smoke (corrente do fumo terciária)

SS: Sidestream Smoke (corrente do fumo secundária)

Note: A *ratio* greater than 1 means that more of a substance is released in SS than in MS.

(Nota: Um ratio maior que 1 quer dizer que: “mais X vezes de uma substância é emitida no fumo sidestream em comparação com o fumo mainstream”)

Código do casal: \_\_\_\_\_

**Entrevista realizada aos casais da Consulta de Infertilidade**

Colocar uma cruz no quadrado que corresponde à resposta correcta. Exemplo ☒

**Data:** \_\_/\_\_/\_\_

**Secção A: Hábitos tabágicos da Mulher**

1. Actualmente fuma? ☐ Sim (Passe para a pergunta 2)  
☐ Não (Passe para a pergunta 3)
  
2. 2.1 Quantos cigarros fuma por dia? \_\_\_\_\_  
2.2 Quantos cigarros fuma por semana? \_\_\_\_\_  
2.3 Quando é que fumou o último cigarro? \_\_\_\_\_  
2.4 Há quantos anos é fumadora? \_\_\_\_\_
  
3. Já alguma vez fumou?  
☐ Sim (Passe para a pergunta 4)    ☐ Não (Passe para a pergunta 5)
  
4. Há quantos anos deixou de fumar? \_\_\_\_\_  
Quantos cigarros fumava por dia? \_\_\_\_\_  
Quantos cigarros fumava por semana? \_\_\_\_\_  
Actualmente, usa algum método farmacológico de cessação tabágica?  
☐ Não    ☐ Sim

5. Frequenta locais em que se sinta exposta ao fumo do tabaco?

☐ Não (Passe para a secção B) ☐ Sim (Passe para a pergunta 6 e secção B)

6. Em que locais sente esta exposição? E com que intensidade?

☐ Domicílio      Intensidade: ☐ Fraca ☐ Moderada ☐ Forte

☐ Local de trabalho      Intensidade: ☐ Fraca ☐ Moderada ☐ Forte

### Secção B: Hábitos tabágicos do Homem

1. Actualmente fuma? ☐ Não (Passe para a pergunta 4)

☐ Sim (Passe para a pergunta 2)

2. 2.1 Quantos cigarros fuma por dia? \_\_\_\_

2.2 Quantos cigarros fuma por semana? \_\_\_\_ (Passe para a pergunta 3)

2.3 Há quantos anos é fumador? \_\_\_\_

3. Já alguma vez fumou? Nem que tenha sido só uma passa?

☐ Não ☐ Sim (Passe para a pergunta 4)

4. Há quantos anos deixou de fumar? \_\_\_\_

Quantos cigarros fumava por dia? \_\_\_\_

Quantos cigarros fumava por semana? \_\_\_\_